

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

PROGRAMA DE DOCTORADO EN BIOCIENCIAS MOLECULARES



**LA INTERACCIÓN PODOPLANINA-CD44 MODULA LA
DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR
ASOCIADA A INVADOPODIOS Y LA TRANSMIGRACIÓN DE
CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOSO A TRAVÉS DE LA
MEMBRANA BASAL**

TESIS DOCTORAL

LUCÍA MONTERO MONTERO

Madrid, 2019

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID



**LA INTERACCIÓN PODOPLANINA-CD44 MODULA LA
DEGRADACIÓN DE LA MATRIZ EXTRACELULAR
ASOCIADA A INVADOPODIOS Y LA TRANSMIGRACIÓN DE
CÉLULAS DE CARCINOMA ESCAMOSO A TRAVÉS DE LA
MEMBRANA BASAL**

Memoria presentada por

LUCÍA MONTERO MONTERO

Licenciada en Bioquímica, para optar al grado de Doctor por la Universidad Autónoma
de Madrid

Directores de tesis:

Dr. Miguel Quintanilla Ávila

Dra. Ester Martín-Villar

Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols” CSIC-UAM



*A mi angel,
que sigue guiando
cada uno de mis pasos*

Cuando crees en algo, cree en ello hasta el final, implícita e incuestionablemente.

Walt Disney

AGRADECIMIENTOS

Siempre recordaré el día que pisé por primera vez el Instituto de Investigaciones Biomédicas “Alberto Sols”, sin saber que se iba a convertir en mi segunda casa y que dejaría en mí una huella que sería imposible de borrar. Siempre recordaré la entrevista en el despacho de Miguel Quintanilla, en la que no solo descubrí a dos proteínas que años después se convertirían en parte de mi vida, sino que también descubrí a la persona que me abriría las puertas de la ciencia, que me enseñaría como funciona este mundo y que me transmitiría esa pasión por la ciencia que traspasa cada uno de sus poros. Muchas gracias “Quinta” por darme la oportunidad de hacer esta tesis doctoral, por creer en mí cuando lo he necesitado y por tantos momentos de risas que no son siempre comunes entre jefes y doctorandos y que en nuestro caso han sido una costumbre. También tengo que agradecer a Miguel que me pusiera en el camino a una de las personas más importantes para mí durante todos estos años, a mi “Esterilla”, mi mentora científica, aunque ella sabe que ha sido mucho más que eso. No hay palabras que puedan agradecer, Ester, todo lo que has hecho por mí estos años, gracias por apoyarme, por comprenderme solo con una mirada, por rescatarme cuando estaba perdida, por intentar tranquilizarme siempre, y por implicarte conmigo tanto, no solo en esta tesis sino también en mi vida personal.

Por supuesto agradecer al Ministerio de Economía y Competitividad y al CSIC, por proporcionarme la financiación necesaria para que haya podido hacer la tesis doctoral durante estos 4 años, así como al programa de doctorado de la UAM. También quiero agradecer a Jaime Renart toda la ayuda prestada en esta tesis, contigo he descubierto todo un mundo de clonajes, y que la ciencia compartida con gente que la vive intensamente, como es tu caso, es mil veces más bonita. A Rosario Perona y Leandro Sastre por adoptarme en su laboratorio de la mejor de las maneras posibles, por estar siempre pendientes de mí tanto en el ámbito científico como en el personal, porque trabajar cerca de gente con una calidad humana tan buena como la vuestra, siempre es un gusto.

Siempre recordaré todas y cada una de las personas que han pasado por el 1.12, y todos los momentos bonitos que he vivido junto a ellos. Gracias a Eli, Patri, Andrés y Juan Carlos porque con risas y buen ambiente se trabaja mucho mejor. A María por estar siempre ahí al pie del cañón y por todas las experiencias juntas, ya sea comer una hamburguesa (junto a nuestra Sandra) o hacer de azafata, que han conseguido sacarme una sonrisa estos años. A mi hermana brasileña de otra madre, Istéfani nunca podré agradecerte lo suficiente lo importante que fue para mí tenerte a mi lado en unos de los peores momentos de mi vida, y lo cerca que procuras estar siempre de mí, aunque nos separen miles de kilómetros, amistades como la nuestra pasan

AGRADECIMIENTOS

solo una vez en la vida. A mis dos niñas Rocío y Carmen, por darme compañía en el laboratorio, apoyo, comprensión y por escucharme cuando lo necesito. A Pilarín por ser un electrón deslocalizado que llena a la gente a su paso de vitalidad y alegría. En general a todos los que han formado parte de alguna manera de esta tesis: Irene, Maria Marta, Gael, Esther, Eva, Antonio, Mariam, Andrea, Laura, Santi, Alex, etc.

No puedo no acordarme de mis laboratorios de acogida el 1.11 y el 2.13, muchas gracias todos por hacerme un huequito cuando me quedé sola. Gracias a Laura I, Blanca, Javi y Bea Mena por las sobremesas de acertijos y las tertulias con café. Muchas gracias a Belén por las risas, a Rosa por su dulzura y comprensión, a Laura P por contar conmigo siempre y ayudarme a tomarme la vida con chocolate que es mucho mejor y a Elena por estar dispuesta siempre a tranquilizarme y darme los consejos que siempre necesito. A mi ángel de la guarda, Cristina, por estar siempre al rescate, por dejar todo por ayudarme, porque sé que siempre va a estar ahí cuando la necesito. Y en especial a mi compañera de fatigas, de penas y alegrías, la persona que ha sido mi paño de lágrimas los dos últimos años, gracias Bea por comprenderme, entenderme y apoyarme, ha sido un placer contar contigo como compañera en esta dura carrera de fondo.

También me gustaría agradecer a todas las personas que han hecho que mi estancia en el IIB estos años sea más agradables. Al laboratorio 1.9, Sandra, Marina, Jose y Ana, por las charlas por los pasillos llenas de risas y buen rollo. Al 1.10, Carla, Patri y Alberto porque con vecinos de labo así, es más divertido trabajar y en especial a Omar por las largas tardes de terapia en mi laboratorio intentando arreglar el mundo y a veces hasta a nosotros mismos, ha sido un placer tenerte de compañero de beca y amigo. Gracias también a todos los que han hecho de pasear por los pasillos del IIB una experiencia tremendamente agradable como Irene, Diego, Gemma Ferrer, Adrian Acuña, Sandra, Inés, Pilar, Natalia, Laura y seguro que me dejo a gente, pero sabéis que todos habéis tenido un huequito siempre en el 1.12. Gracias a todos los servicios del IIB, en especial a genómica por ayudarme con las secuenciaciones hasta conseguir clonar las benditas isoformas, a animalario, sobre todo a Graci y Leti que se han vuelto locas pasándome ratones para poder extraer membrana que se rompían con mirarlas, a todos los “panchos” que han dado su vida por donar membrana de mesenterio y que están infravalorados, y al servicio de microscopía Diego, Lucía y Mónica que han terminado odiando las membranas más que yo, gracias a Mónica por los ratitos de charla en la soledad del confocal que tan bien me han hecho.

Muchísimas gracias al laboratorio de la doctora Maddy Parsons, en el King's College London, donde realicé una estancia durante tres meses, que me enseñó mucho de ciencia, pero todavía

más de la vida. Muchas gracias a todos mis compis de Londres que me hicieron esa etapa de mi vida mucho más fácil.

Dicen que quien tiene un amigo tiene un tesoro, yo puedo presumir de ser afortunada. Gracias a mis compañeros de universidad que ayudaron a que me descartara por la opción de hacer una tesis. Gracias a mis Biogirls Ana, Lucía, Sara y Marta por estar siempre ahí a pesar de que pasen los años. A Bea por ser mi media naranja durante la carrera, y durante muchos años más, porque encontrar a alguien que sepa lo que piensas con mirarte un microsegundo es muy difícil y ella lo consigue siempre. A Alba por ser ella, por no dejarme nunca caer y cuando lo he hecho ayudarme a levantarme, porque nuestra amistad siempre será especial y única, porque pocas personas me comprenden como ella lo hace. A mis amigas de toda la vida, mis locas preferidas: Alba, Liber, Rocío, Nerea Mateo, Sonia y Nerea Lucía, por estar en los momentos más difíciles de mi vida, por intentar entenderme siempre a mí y al loco mundo de la ciencia y por apoyarme en todo lo que hago. A Raúl por aguantarme en el peor periodo de la tesis, el de escritura, escucharme, calmarme y sobre todo por distraerme. Y gracias a todos mis amigos que han contribuido a distraerme y que han hecho que todo esto sea más llevadero.

A mi familia, por apoyarme siempre, creer en mí y darme la confianza necesaria para seguir adelante, incluso estando lejos como mi familia materna o mi familia de Barcelona. En especial quería agradecer a mi Lolita, por ser siempre tan especial conmigo y con mi madre, por acordarte de mí siempre y porque sé que te va a hacer mucha ilusión salir en estos agradecimientos. A Sofía por sostenerme y no dejarme caer en el momento más difícil de mi vida y a mi tía Fina por todo lo que ha hecho por mí y por mis padres, por ayudarme tanto cuando yo estuve fuera y porque es una de las personas más buenas que conozco. A mi abuela Lucía porque fue la primera en creer en mí y animarme a pelear por mis sueños.

Una de las personas más importante en estos años y la más especial de mi vida es mi padre, el mejor hombre que conozco, la persona que más ha luchado siempre por mi bienestar y el de mi madre, gracias por quererme a mí, pero sobre todo gracias por quererla a ella siempre por encima de todas las cosas. Nunca podré ni olvidar ni agradecerte lo necesario, todo lo que has hecho por las dos, te quiero. Y por último quiero agradecer a la persona más especial de mi vida, a mi pilar fundamental, a pesar de que no esté conmigo en cuerpo siempre estará conmigo en alma, gracias mamá por ser la única que me escuchó, me comprendió y me entendió completamente, por los consejos que tanto me han ayudado el resto de mi vida y sobre todo por ayudarme a convertirme en la persona que soy hoy en día. Esta tesis es algo que hemos conseguido juntas, te quiero y te querré siempre.

RESUMEN Y ABSTRACT

Podoplanina es una glicoproteína transmembrana asociada con la progresión maligna de carcinomas escamosos (SCCs). CD44 engloba un conjunto de isoformas que se generan por “splicing” alternativo a partir de un único gen. En esta tesis, hemos analizado la interrelación de podoplanina con CD44, caracterizando las isoformas específicas de CD44 que pueden asociarse con podoplanina, e investigando su implicación en la invasión tumoral. Hemos llevado a cabo varios análisis *in vivo* e *in vitro* que muestran que la expresión de podoplanina se induce de forma coordinada con la isoforma estándar CD44s y algunas isoformas variables CD44v, en la piel de ratón estimulada por TPA y en células tumorales. En líneas celulares murinas representativas de diferentes estadios de la carcinogénesis describimos, además, un cambio en la expresión de isoformas CD44v a CD44s asociado con la progresión a carcinomas indiferenciados (SpCC), y a CD44v10 como la única isoforma variable expresada en células SpCC. Por otro lado, hemos caracterizado a CD44v3-10, CD44v6-10 y CD44v8-10 como las principales isoformas variables expresadas en líneas celulares humanas de SCC. Tanto CD44s como las isoformas CD44v identificadas co-localizan con podoplanina en la superficie celular, así como en el anillo de adhesión de los invadopodios. Mediante ensayos de co-inmunoprecipitación demostramos que podoplanina interacciona físicamente tanto con CD44s como con las isoformas CD44v mencionadas anteriormente. Esta interacción ocurre principalmente por el dominio transmembrana, aunque requiere el dominio citoplasmático y se modula negativamente por la glicosilación del dominio extracelular.

Con el fin de determinar el impacto de la asociación podoplanina-CD44 en la invasión tumoral, investigamos la degradación de la matriz extracelular (MEC) mediada por invadopodios empleando células de SCC manipuladas genéticamente para silenciar la expresión de podoplanina y/o CD44. Los resultados obtenidos sugieren que ambas proteínas están implicadas en la degradación de la MEC mediada por invadopodios, aunque su función es diferente. Podoplanina promueve la estabilidad de los invadopodios y una degradación focalizada, eficiente, de la MEC. CD44, en cambio, no afecta a la estabilidad de los invadopodios, pero es necesaria para mantener el control espacial de la actividad proteolítica; CD44s es la isoforma principal involucrada en esta función. Ensayos de invasión *ex vivo*, utilizando una membrana basal nativa, indican que tanto podoplanina como CD44 son esenciales para promover la invasión de células de SCC a través de la membrana basal. Finalmente, resultados colaterales de este trabajo sugieren que la asociación de podoplanina y CD44 tiene un papel en la división celular, probablemente en el control de la citocinesis.

Podoplanin is a transmembrane glycoprotein associated with malignant progression of squamous cell carcinomas (SCCs). CD44 comprises a variety of isoforms generated by alternative splicing from a single gene. In this thesis, we have analyzed the functional relationship between podoplanin and CD44 by characterizing the specific CD44 isoforms that could associate with podoplanin, and by investigating the involvement of podoplanin-CD44 association in tumor invasion. We have performed several analyses *in vivo* and *in vitro* showing that the expression of podoplanin is coordinated with those of the CD44s standard isoform and some CD44v variable isoforms in mouse skin stimulated with TPA as well as in tumor cells. We also describe a switch from the expression of CD44v to CD44s in mouse cell lines representative of different stages of skin carcinogenesis, associated with progression to undifferentiated spindle cell carcinomas (SpCCs), as well as the identification of CD44v10 as the only variable isoform expressed in SpCC cells. On the other hand, CD44v3-10, CD44v6-10 and CD44v8-10 were characterized as the main variable isoforms expressed in human SCC cell lines. Both CD44s and the above mentioned CD44v isoforms co-localize with podoplanin on the cell surface and in the adhesion ring of invadopodia. Podoplanin physically interacts with both CD44s and CD44v isoforms. This interaction is primarily mediated by the transmembrane domain, although requires the cytoplasmic tail and is modulated by glycosylation of the extracellular domain.

In order to determine the relevance of podoplanin-CD44 association on tumor invasion, we analyze invadopodia-mediated degradation of the extracellular matrix (ECM), using SCC cells genetically engineered to silence podoplanin and/or CD44 expression. Our results suggest that both proteins are involved in invadopodia-mediated ECM degradation, although they carry out different functions. Podoplanin promotes invadopodia stability and an efficient, focal, ECM degradation. CD44, on the other hand, does not affect invadopodia stability, but is necessary to maintain the spatial control of proteolytic activity. CD44s is the main isoform involved in this function. *Ex vivo* invasion assays using a native basement membrane suggest a key role for both podoplanin and CD44 on SCC cell transmigration through the basement membrane. Finally, collateral results in this work point to a role of podoplanin-CD44 association during cell division, likely on the control of cytokinesis.

ÍNDICE

AGRADECIMIENTOS.....	11
RESUMEN Y ABSTRACT.....	17
ÍNDICE.....	23
ABREVIATURAS.....	29
INTRODUCCIÓN.....	35
1. EL CARCINOMA ESCAMOSO.....	37
2. LA CARCINOGENÉISIS QUÍMICA DE PIEL DE RATÓN COMO MODELO DE ESTUDIO DE CARCINOMAS ESCAMOSOS.....	38
3. MECANISMOS DE INVASIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES.....	40
4. INVADOPODIOS: UNA ESTRUCTURA CLAVE PARA LA INVASIÓN TUMORAL.....	42
5. CD44: UN RECEPTOR DE ADHESIÓN QUE PROMUEVE LA MIGRACIÓN Y LA INVASIÓN TUMORAL.....	45
5.1 Origen y estructura.....	45
5.2. Función biológica de CD44.....	46
5.3. Función de CD44 en el cáncer.....	48
6. PODOPLANINA: UNA GLICOPROTEÍNA TRANSMEMBRANA IMPLICADA EN LA MIGRACIÓN Y LA INVASIÓN TUMORAL.....	49
6.1 Origen y estructura.....	49
6.2. Interacción de podoplanina con otras proteínas.....	51
6.3. Función de podoplanina en cáncer.....	53
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	55
MATERIALES Y MÉTODOS.....	59
1. CLONAJES Y CONSTRUCCIONES DE DNA.....	61
2. ANTICUERPOS.....	64
3. MÉTODOS DE CULTIVO CELULAR.....	65
3.1 Cultivos celulares.....	65
3.2 Transfecciones transitorias.....	66
3.3 Infección con lentivirus.....	66
3.4 Interferencia de RNA.....	67

ÍNDICE

4. ANÁLISIS DE RNA.....	67
4.1 Extracción de RNA total.....	67
4.2 RT-PCR	67
5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS	68
5.1 Inmunotransferencia (Western blot)	68
5.2 Ensayo de co-inmunoprecipitación de proteínas.....	69
6. TRATAMIENTO IN VIVO CON TPA	69
7. ANÁLISIS DE INMUNOFLORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL	70
7.1 Inmunofluorescencia en cultivos celulares	71
7.2 Ensayos de degradación de gelatina	71
7.3 Análisis de invadopodios en células vivas	72
7.4 Ensayos de invasión ex vivo sobre en membrana de mesenterio de ratón.....	72
8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS	73
RESULTADOS	75
1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN CONJUNTA DE PODOPLANINA Y CD44 IN VIVO E IN VITRO	77
1.1 TPA induce la expresión de podoplanina y CD44 de forma coordinada en la piel de ratón.....	77
1.2 Expresión de podoplanina y CD44 en líneas celulares del modelo de carcinogénesis química en piel de ratón	78
1.3 Podoplanina se expresa conjuntamente con CD44s y varias isoformas CD44v en líneas celulares humanas de SCCs	80
2. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE PODOPLANINA CON CD44s Y CD44v Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS IMPLICADOS	84
2.1 Aislamiento y caracterización de los cDNAs correspondientes a las diferentes isoformas de CD44	84
2.2 Podoplanina interacciona con las isoformas CD44v	86
2.3 Análisis de los dominios estructurales de podoplanina implicados en la interacción con CD44	88
2.4 La glicosilación del dominio extracelular de podoplanina modula negativamente su interacción con CD44	90

2.5 El dominio transmembrana de podoplanina es crítico para su interacción con CD44.....	92
3. ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE LA INTERACCIÓN PODOPLANINA-CD44 EN LA FORMACIÓN DE INVADOPODIOS ACTIVOS Y EN LA INVASIÓN DE LAS CÉLULAS SCC A TRAVÉS DE LA MEMBRANA BASAL	94
3.1 Podoplanina, CD44s y CD44v se localizan en el anillo de adhesión de los invadopodios.....	94
3.2 Podoplanina y CD44 cooperan para promover una actividad proteolítica eficiente de los invadopodios	97
3.3 Podoplanina, pero no CD44, regula la estabilidad de los invadopodios	99
3.4 La expresión de isoformas CD44 individuales en células CD44-deficientes rescata el fenotipo de degradación anómala de la MEC.....	100
3.5 El silenciamiento de CD44 induce la formación de células binucleadas	104
3.6 Relevancia de la interacción podoplanina-CD44 en la invasividad de células SCC	104
DISCUSIÓN.....	109
CONCLUSIONES Y	123
CONCLUSIONS	123
BIBLIOGRAFÍA.....	129
ANEXO I	145
ANEXO II	149

ABREVIATURAS

- BCA: ácido bicinconínico
- BCC: carcinomas de células basales
- CAFs: fibroblastos asociados a tumores
- CD44s: isoforma estándar de CD44
- CD44v: isoformas variables de CD44
- CD-E: E cadherina
- CDK: quinasa dependiente de ciclinas
- cDNA: DNA complementario
- CIC: célula iniciadora de tumores
- CSC: célula troncal tumoral
- CT: dominio citoplasmático
- DAPI: 4', 6-diamidino-2-fenilindol
- DMBA: 7,12-dimetilbenz[a]-antraceno
- DMEM: medio Eagle modificado por Dulbecco
- EC: dominio extracelular
- EGF: factor de crecimiento epidémico
- EGFP: proteína verde fluorescente potenciada
- EGFR: receptor de EGF
- ERM: ezrina, radixina, moesina
- ETOH: etanol
- EYFP: proteína amarilla fluorescente potenciada
- F-actina: filamentos de actina
- FAK: quinasa de adhesión focal
- FBS: suero fetal bovino
- FGF: factor de crecimiento de fibroblastos
- FLIM: microscopía de fluorescencia sobre células vivas
- FRET: transferencia de energía de resonancia fluorescente
- GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
- GPA: glicoforina A
- Ha: hemaglutinina
- HNSCC: carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello
- HPV: virus del papiloma humano

ABREVIATURAS

- HSPA9: proteína de choque térmico A9
- H&E: hematoxilina-Eosina
- IF: inmunofluorescencia
- IP: inmunoprecipitación
- K: queratinas
- kDa: kilodaltons
- LIMK: LIM quinasa
- Lor: loricrina
- MEC: matriz extracelular
- MMPs: metaloproteasas de matriz
- mRNA: RNA mensajero
- NH₄OH: hidróxido de amonio
- pb: pares de bases
- PBS: tampón fosfato salino
- PCR: reacción en cadena de la polimerasa
- PDGF: factor de crecimiento derivado de plaquetas
- PDPN: podoplanina
- PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa
- PKA: proteína quinasa A
- PKC: proteína quinasa C
- RFP: proteína roja fluorescente
- ROCK: quinasa dependiente de Rho GTPasas
- RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
- SCCs: carcinoma de células escamosas
- SDS: dodecil sulfato sódico
- SDS-PAGE: electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
- siRNA: RNA pequeño de interferencia
- SYN: sinaptobrevina
- TEM: transición epitelio-mesénquima
- TGF- β : factor de crecimiento transformante tipo β
- TM: dominio transmembrana
- TME: transición mesénquima-epitelio
- TPA: 12 - O -tetradecanoilforbol-13-acetato
- UTR: región no traducida

- UV: ultravioleta
- V: vimentina
- VEGF: factor de crecimientos endotelial vascular
- WASP: proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich
- WB: western blot

INTRODUCCIÓN

1. EL CARCINOMA ESCAMOSO

Los carcinomas de células escamosas (SCC) son tumores que generalmente surgen de epitelios estratificados, los cuales incluyen la piel, el esófago y la cavidad oral (epitelios estratificados escamosos) y las mucosas de las vías respiratorias (epitelios pseudoestratificados no escamosos). El rasgo histológico principal que caracteriza a los SCC es la presencia de diferenciación escamosa visible en forma de perlas de queratina, aunque también comparten otros rasgos como determinadas mutaciones genéticas y la expresión de marcadores de diferenciación escamosa. Estos tumores se clasifican según su localización, siendo los más frecuentes aquellos que aparecen en la piel, en la cabeza y el cuello, el esófago, el pulmón y el cuello cervical uterino. Aunque de forma menos frecuente, estos tumores también pueden aparecer en el páncreas, el tiroides, la vejiga y la próstata ([Sánchez-Danés et al., 2018](#)). Los SCC son los tumores sólidos malignos más comunes en humanos, constituyendo el 80% de los nuevos cánceres diagnosticados cada año, lo que supone una de las principales causas de mortalidad en el mundo ([Goldie et al., 2019](#)). Dentro de los SCC, nos vamos a centrar en este trabajo en los de piel y cabeza y cuello por ser los de mayor incidencia.

Los SCC cutáneos son, junto con los carcinomas de células basales (BCCs), los tipos de cáncer de piel no-melanoma más comunes. Los datos de incidencia publicados para esta patología son inexactos debido a que los estudios epidemiológicos tienden a agrupar estos carcinomas junto a otros SCCs, o a agruparlos junto a los BCC ([Skulsky et al., 2017](#)). Sin embargo, se conoce que la incidencia es mayor en personas de edad avanzada, en hombres respecto a mujeres, en individuos de piel caucásica comparados con los de piel morena y en pacientes inmunodeprimidos. El principal factor de riesgo de esta patología es la exposición a la radiación solar ultravioleta (UV), siendo las zonas del cuerpo expuestas al sol las zonas de mayor incidencia. Pero también hay otros factores de riesgo, como la inmunosupresión, la exposición a agentes químicos y el tabaco. Además, existe una predisposición genética a padecer estos cánceres en pacientes con determinados desórdenes hereditarios, como es el caso del xeroderma pigmentoso y el albinismo, que ocurren en individuos que heredan mutaciones en enzimas responsables de la reparación al daño al DNA producido por la radiación UV (reparación por escisión de nucleótidos) y enzimas implicados en la síntesis de melanina, respectivamente ([Green and Olsen, 2017](#)). El principal tratamiento de estos tumores suele ser la cirugía, sin aparentes complicaciones, sin embargo, un 5% de los pacientes presentan recidivas y metástasis a los 5 años, con únicamente un 10-20% de supervivencia a más de 10 años ([Goldie et al., 2019](#)).

INTRODUCCIÓN

Respecto a los carcinomas de cabeza y cuello (HNSCC), es decir a los que se originan en la cavidad oral, la faringe o la laringe, su incidencia anual está en torno a 600.000 nuevos casos en el mundo. Esta patología está ligada a una edad avanzada y a un historial de consumo de alcohol y tabaco, principalmente a este último. La infección con el virus del papiloma humano 16 (HPV16), supone otro factor de riesgo importante en el desarrollo del HNSCC, siendo la infección por este virus un marcador de mal pronóstico (Jou and Hess, 2017). Se han identificado diversas mutaciones en genes implicados en procesos de proliferación y supervivencia celular (TP53, HRAS, EGFR, PIK3CA), control del ciclo celular (CDKN2A y CCND1), diferenciación (NOTCH1), señalización y adhesión (FAT1) (Zhou et al., 2016). Las mutaciones en oncogenes importantes, puede ser la causa de que los HNSCC sean los SCC más agresivos. Estos pacientes, a pesar de someterse a terapias como cirugía, radiación, quimioterapia o anticuerpos monoclonales, terminan desarrollando resistencia, que desembocan en la aparición de recidivas y metástasis que elevan mucho la tasa de mortalidad (Méry et al., 2017). La mayor agresividad de estos tumores se produce cuando la célula de origen es una célula madre, que al sufrir una mutación en alguno de los genes indicados anteriormente se convierte en una célula iniciadora de tumores (CIC), que al expandirse clonalmente da lugar a un tumor de forma más rápida y con una mayor predisposición a las recidivas (Goldie et al., 2019). En este sentido, es importante conocer la función biológica de moléculas cuya expresión es característica de esta población celular, como es el caso de CD44 (Prince et al., 2007), para, así, poder entender mejor la biología de estos tumores, conseguir realizar un diagnóstico precoz, e identificar nuevas dianas terapéuticas para estas patologías.

2. LA CARCINOGENÉISIS QUÍMICA DE PIEL DE RATÓN COMO MODELO DE ESTUDIO DE CARCINOMAS ESCAMOSOS

La carcinogénesis química de piel de ratón representa uno de los modelos *in vivo* mejor establecidos para el estudio de la progresión tumoral y de la formación de SCCs (Abel et al., 2009). La iniciación de la carcinogénesis consiste en la aplicación en la piel de una única dosis de un carcinógeno químico, 7,12-dimetilbenz[a]antraceno (DMBA), seguido por aplicaciones repetidas (una o dos veces por semana) de un promotor tumoral, como el éster del forbol TPA. Al cabo de unas ocho semanas, aparecen en la piel papilomas benignos, la mayoría de los cuales se reabsorben y desaparecen tras suspender el tratamiento con el promotor, pero una fracción de ellos (1-10%, dependiendo de la cepa del ratón) progresa espontáneamente a SCCs. La iniciación implica la formación de una población de células “iniciadas” que tienen el gen H-Ras1 mutado (Figura 1), una transversión A-T, que origina un cambio de Gln por Leu en la proteína

(Quintanilla et al., 1986), mientras que la promoción por TPA promueve la expansión clonal de las células iniciadas para dar lugar a los papilomas. La conversión papiloma–SCC conlleva una desorganización completa de la arquitectura de la epidermis, una pérdida de la polaridad celular, un aumento de aberraciones cromosómicas (Abel et al., 2009), la mutación de otros genes, como el supresor Trp53 (Burns et al., 1991; Ruggeri et al., 1991) y cambios en la expresión de proteínas de adhesión célula-célula (Navarro et al., 1991) y de marcadores de diferenciación (Figura 1), como una disminución de la expresión de queratinas de las capas suprabasales diferenciadas de la epidermis (K1, K10) y un aumento de queratinas características de epitelios simples (K8, K18) (Díaz-Guerra et al., 1992).

Los SCCs se clasifican histológicamente como bien diferenciados, moderadamente diferenciados y pobremente diferenciados, también conocidos como carcinomas fusocelulares (“spindle cell carcinoma”, SpCC), un tipo de tumor muy invasivo y metastásico. La progresión SCC-SpCC se considera la última etapa de la progresión maligna e implica una transición epitelio-mesénquima (TEM), con la pérdida de marcadores de la diferenciación epitelial (E-cadherina, queratinas) y la ganancia de marcadores mesenquimáticos (vimentina), cuyo agente fisiológico es el factor de crecimiento TGF- β (Caulín et al., 1995; Cui et al., 1996). La transición SCC-SpCC correlaciona con un aumento de la expresión de H-ras oncogénico, así como con mutaciones inactivantes en el locus Ink4/Arf, que codifica los reguladores del ciclo celular p15Ink4b, p16Ink4a y p19Arf (Linardopoulos et al., 1995) (Figura 1).

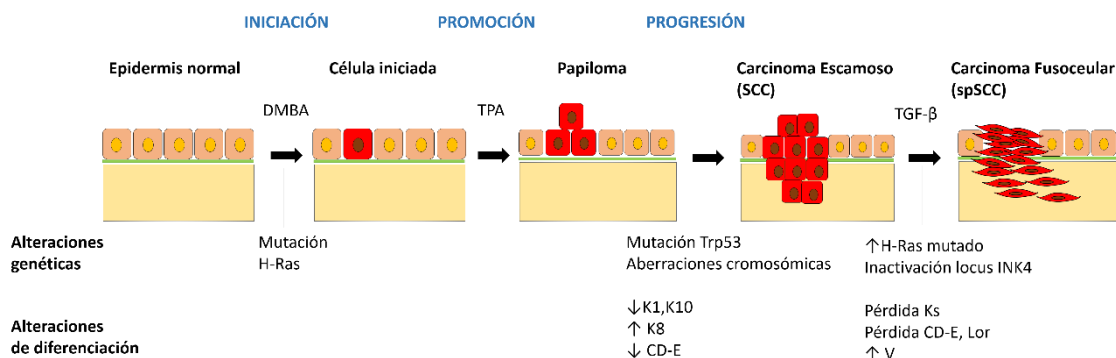


Figura 1: Representación esquemática del modelo de carcinogénesis química en piel de ratón. El esquema muestra las diferentes etapas del desarrollo tumoral, los genes mutados asociados con cada etapa, y los cambios en la expresión de marcadores de diferenciación. CD-E: E-cadherina, Lor: Loricrina, V: Vimentina, K: queratinas.

Este modelo se viene utilizando para distintos propósitos, desde evaluar el potencial procarcinogénico o anti-carcinogénico de diferentes compuestos, a analizar la función de potenciales proto-oncogenes y genes supresores en el cáncer epitelial, y dilucidar si están

implicados en la iniciación o en la progresión de la carcinogénesis, mediante ratones modificados genéticamente sometidos a la carcinogénesis con DMBA/TPA (Abel et al., 2009).

3. MECANISMOS DE INVASIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES

La invasión tumoral y la metástasis es uno de los sellos distintivos del cáncer (Hanahan and Weinberg, 2000). Los tumores benignos, como los papilomas, o pre-malignos, como los carcinomas *in situ*, están localizados en el epitelio donde se originaron. Para la formación de un carcinoma maligno, algunas células de esos tumores deben atravesar la membrana basal, migrar e invadir el tejido adyacente. Eventualmente, las células de los carcinomas pueden penetrar en los vasos linfáticos o sanguíneos e incorporarse al torrente circulatorio para producir tumores secundarios (metástasis) en tejidos u órganos distantes del tumor primario (Figura 2). Los procesos de invasión en el cáncer epitelial ocurren por dos mecanismos principales: la migración colectiva de grupos o cohortes de células epiteliales o la migración individual de células que sufren una transición epitelio-mesénquima (TEM).

La TEM se define como el conjunto de procesos que conducen a la pérdida de las características epiteliales a cambio de la adquisición de características mesenquimáticas (Lamouille et al., 2014; Thiery, 2003; Thiery and Sleeman, 2006). Esta conversión conlleva cambios complejos, tanto en la arquitectura como en el comportamiento celular, tales como la pérdida de las uniones adherentes que mantienen las células agrupadas, la pérdida de la polaridad apico-basal y una reorganización del citoesqueleto; en resumen, una reprogramación de la expresión génica. En general, en las TEM que ocurren *in vivo*, las células no pierden todas las características epiteliales, a pesar de adquirir características mesenquimáticas, mostrando un fenotipo mixto, lo que se conoce como una TEM parcial. La TEM es un proceso clave en el desarrollo embrionario. En los organismos adultos, la TEM puede ocurrir como una respuesta fisiológica al daño tisular, como en la cicatrización de heridas, y en situaciones patológicas, como la fibrosis y el cáncer (Thiery and Sleeman, 2006). Durante la TEM se observa una disminución de los niveles de expresión de E-cadherina, el principal componente de las uniones adherentes, provocada por factores de transcripción, como Snail-1, Snail-2 (Slug), Twist, E47 y Zeb, que actúan como represores de su transcripción e inductores de la expresión de genes mesenquimáticos. El cambio E-cadherina/N-cadherina está relacionado con un aumento de la motilidad y migración de las células tumorales, ya que N-cadherina media la adhesión de las células tumorales con las células del estroma y se une y activa al receptor del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) (Christofori, 2006). Otro rasgo característico de la TEM es la desregulación de vías de señalización de proliferación y supervivencia celular, como es el caso

de las RhoGTPasas, las quinasas Src y Fak, la vía de las MAP quinasas o la vía de PI3K-AKT (Lamouille et al., 2014).

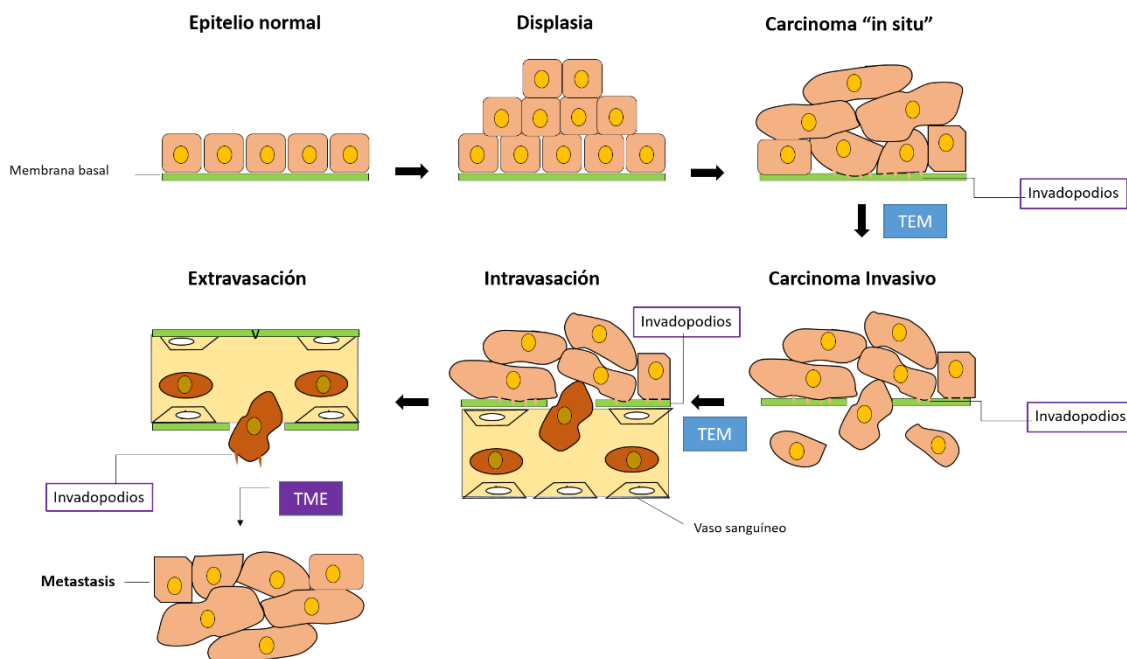


Figura 2: Esquema de la progresión tumoral y de la transición epitelio-mesénquima. La figura muestra las distintas etapas de la cascada metastásica. TEM: transición epitelio mesénquima. TME: Transición mesénquima-epitelio. Adaptada de (Thiery, 2002).

Los SCC bien diferenciados presentan, en general, una migración colectiva, en forma de filas o agrupaciones de células epiteliales, que ensamblan los filamentos de actina corticales a través de las uniones adherentes, formando una unidad funcional, y presentan una mayor expresión de metaloproteasas que degradan la matriz extracelular de manera polarizada. Sin embargo, en SCC moderadamente o pobremente diferenciados, en los cuales se ha producido una TEM parcial o completa, existen células tumorales que presentan una migración individual de tipo ameboide o mesenquimático (Friedl et al., 2004). La migración de tipo mesenquimático tiene lugar mediante extensiones de la membrana plasmática, denominadas lamelipodios, impulsadas por la polimerización de actina, que se unen a la matriz extracelular (MEC) formando nuevas adhesiones o contactos focales que al estabilizarse crean una tensión en los filamentos de actina (F-actina), conocidos como fibras de estrés, que mediante una contracción actina-miosina mueven el núcleo y el cuerpo celular en la dirección de la migración y promueven la rotura o deadhesión de los contactos focales en la parte trasera de la célula. Este tipo de migración es más dependiente de integrinas y metaloproteasas, que degradan la MEC y abren hueco para que la célula pueda moverse por la intrincada maraña de la MEC. La migración de tipo ameboide se produce, fundamentalmente, por la contracción actina-miosina, que provoca la infiltración

INTRODUCCIÓN

de las células entre los intersticios de la MEC, y es, por tanto, menos dependiente de integrinas y metaloproteasas (Titus and Goodson, 2017).

Durante la metástasis, tras la extravasación de los vasos sanguíneos y la formación de un foco secundario, las células que han sufrido una TEM deben experimentar el proceso inverso, es decir, una transición mesénquima-epitelio (TME), ya que se ha observado que, por regla general, las metástasis de los carcinomas conservan el fenotipo epitelial del tumor primario. Este proceso parece ser importante para que las micrometástasis puedan crecer y desarrollar un tumor secundario (Thiery et al., 2009) (Figura 2).

En cualquier caso, sea cual sea el mecanismo de migración, las células tumorales para que puedan metastatizar deben atravesar unas cuantas barreras tisulares, tales como la membrana basal que separa los epitelios del tejido conjuntivo adyacente y rodea a las células endoteliales de los vasos sanguíneos, una densa MEC formada principalmente por laminina 5 y colágeno IV (Figura 2). Para este menester, las células de los SCCs y de otros tipos de tumores utilizan unas estructuras altamente especializadas llamadas invadopodios (Lohmer et al., 2014).

4. INVADOPODIOS: UNA ESTRUCTURA CLAVE PARA LA INVASIÓN TUMORAL

Se denomina matriz extracelular (MEC) al conjunto de la membrana basal y la matriz intersticial, compuesta por colágenos fibrilares, proteoglicanos, glicoproteínas y polisacáridos. Su principal función es mantener los tejidos separados y favorecer la integridad y la arquitectura celular. Como se ha mencionado anteriormente, las células tumorales necesitan remodelar y degradar la MEC para poder invadir los tejidos vecinos e infiltrarse en el interior de los vasos sanguíneos (Figura 2). Unas estructuras claves para esta función son los denominados invadosomas. Los invadosomas son proyecciones dinámicas de la membrana plasmática, inducidas, como en el caso de los lamelipodios (y de otras estructuras asociadas con la motilidad, como filopodios y “ruffles”) por la polimerización de actina. A diferencia de los lamelipodios, los invadosomas son capaces de degradar y remodelar la matriz extracelular, ya que poseen actividad proteolítica (Weaver, 2006). Invadosoma es un término que engloba a podosomas e invadopodios, los cuales poseen ciertas semejanzas estructurales y funcionales (Paterson and Courtneidge, 2018). La principal diferencia entre podosomas e invadopodios es que los primeros son característicos de células normales que atraviesan o remodelan tejidos, tales como osteoclastos, macrófagos y células embrionarias de las crestas neurales, mientras que los segundos son característicos de las células tumorales. Además, los invadopodios alcanzan mayor

longitud o profundidad ($> 2\mu\text{m}$) que los podosomas ($0,5\text{-}2\mu\text{m}$) y son más estables. Estas características dotan a las células tumorales de una mayor capacidad degradativa (Murphy and Courtneidge, 2011).

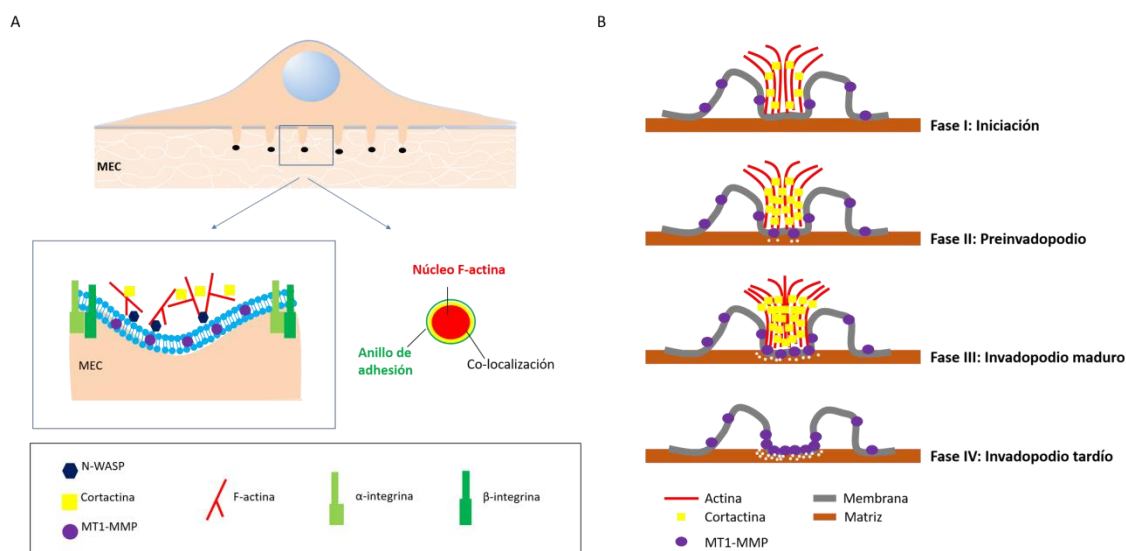


Figura 3: Estructura y fases implicadas en la formación de los invadopodios. (A) Los invadopodios están compuestos por un núcleo de F-actina rodeada de un anillo de adhesión (constituido principalmente por integrinas). En su interior coexisten un gran número de proteínas implicadas en la polimerización y regulación de la dinámica de F-actina, como N-WASP y cortactina, así como moléculas de señalización y proteasas de la MEC, principalmente MT1-MMP. (B) Representación esquemática de las fases implicadas en la formación de invadopodios activos, según Artym y colaboradores (Artym et al., 2006).

Los invadopodios están compuestos por un núcleo denso de F-actina rodeado por proteínas de adhesión y proteínas de andamiaje. En su interior, un amplio grupo de proteínas implicadas en la nucleación, polimerización y fragmentación de F-actina, tales como Arp2/3, N-WASP, WIP, la GTPasa Cdc42, Nck, cofilina, cortactina, dinamina y proteínas de andamiaje, como TKS5, que es un sustrato de la tirosina quinasa Src, regulan la dinámica del citoesqueleto de actina (Figura 3A) (Parekh and Weaver, 2016; Paterson and Courtneidge, 2018). Entre los receptores de adhesión se han descrito integrinas, principalmente $\beta 1$ y $\alpha V\beta 3$, y el receptor de ácido hialurónico CD44 (Di Martino et al., 2016). Otros componentes claves de los invadopodios son las proteasas, se ha descrito la presencia de metaloproteasas reguladas por zinc: MMP-2, MMP-9, la metaloproteasa transmembrana MT1-MMP (también llamada MMP14) y proteasas de la familia ADAM; cisteína proteasas: catepsina B; y serin proteasas: seprasa y el activador del plasminógeno tipo uroquinasa (Paterson and Courtneidge, 2018). De todas ellas, el regulador principal de la función de invadopodios parece ser MT1-MMP (Artym et al., 2006). Estas proteasas no sólo tienen como función degradar y remodelar la MEC en los invadopodios, sino

INTRODUCCIÓN

también controlar el crecimiento celular, la apoptosis y las comunicaciones intercelulares, a través de la activación proteolítica de factores de crecimiento, como TGF- β (Sternlicht and Werb, 2001).

Numerosos estudios sugieren que la formación de invadopodios responde a estímulos ambientales y a moléculas de señalización. Se ha propuesto que tanto factores de crecimiento, como VEGF, PDGF y EGF, como un pH ácido, el aumento de la rigidez y la densidad del sustrato, la hipoxia y las especies reactivas de oxígeno son factores claves para la inducción de la formación de invadopodios en las células tumorales (Paterson and Courtneidge, 2018). Basándose en sus estudios de microscopía de fluorescencia e imagen en células vivas, Artym y colaboradores definen cuatro fases para la formación de los invadopodios (Figura 3B) (Artym et al., 2006). El invadopodio comienza a formarse en un sitio de iniciación donde se acumula F-actina y cortactina en zonas de adhesión de la membrana plasmática a la MEC (fase I). El inicio del reclutamiento de MT1-MMP al sitio de iniciación define el estadio de pre-invadopodio (fase II). Esta fase implica una acumulación continua de F-actina y cortactina y un aumento de MT1-MMP que conduce a la formación de un invadopodio maduro, estable, y a la degradación focal de la MEC (fase III). La dispersión de F-actina y cortactina del invadopodio maduro determina la formación del invadopodio tardío, el cual todavía contiene MT1-MMP acumulada capaz de continuar una degradación focal (fase IV).

Los invadopodios son estructuras claves en la invasión tumoral, ya que están implicados en varias etapas de la cascada metastásica. En primer lugar, son capaces de degradar la membrana basal, permitiendo que las células tumorales invadan el tejido conjuntivo adyacente. En segundo lugar, colaboran en los procesos de intravasación y extravasación degradando las paredes de los vasos sanguíneos. Además, recientemente se ha descrito la importancia de los invadopodios para el crecimiento tumoral en el nicho metastásico, ya que la delección de proteínas importantes para la función de los invadopodios reduce el crecimiento de las metástasis en determinados contextos (Paterson and Courtneidge, 2018).

Se ha descrito la existencia de una cooperación funcional entre invadopodios y exosomas en las células tumorales. Una disminución de la producción de exosomas en determinadas células tumorales produce una reducción tanto en la formación de invadopodios como en la degradación de la MEC mediada por ellos, sugiriendo que los exosomas son cruciales para la biogénesis y actividad de los invadopodios. Este hecho se debe a que los exosomas son los encargados de transportar tanto las MMPs responsables de la degradación de la MEC mediada por invadopodios, como las proteínas, lípidos y RNA necesarios para su formación (Liu et al.,

2009). Además, se ha observado que la delección de proteínas importantes para la función de los invadopodios, como es el caso de Tsk5, disminuye significativamente el número de exosomas secretados al exterior, sugiriendo que los invadopodios son sitios claves para la liberación de exosomas (Hoshino et al., 2013).

5. CD44: UN RECEPTOR DE ADHESIÓN QUE PROMUEVE LA MIGRACIÓN Y LA INVASIÓN TUMORAL

5.1 Origen y estructura

CD44 fue descubierto por primera vez como un antígeno reconocido por un anticuerpo monoclonal contra leucocitos humanos (Naor et al., 1997). Estudios posteriores mostraron que este epítipo era común a un grupo polimórfico de proteínas (80-250KDa) presentes en la superficie de la mayoría de células de vertebrados (Ponta et al., 2003). CD44 engloba un conjunto de glicoproteínas transmembrana de tipo I generadas a partir de un único gen por un complejo proceso de “splicing” alternativo (Figura 4). El gen de CD44 consta de diez exones constantes (C1-C10) que se expresan de manera constitutiva en la mayoría de las isoformas y diez exones variables (V1-V10) que pueden expresarse o no, dependiendo de la isoforma. En humanos, el exón V1 no se expresa, mientras que este exón sí se expresa en ratón. De esta manera, se pueden distinguir dos grupos de isoformas, una isoforma más pequeña que solo presenta los exones constantes, denominada isoforma estándar (CD44s), la cual se expresa de manera ubicua en prácticamente todos los tejidos, y varias isoformas que además de los exones constantes presentan determinados exones variables y se denominan isoformas variables (CD44v), cuya expresión es específica de tejido (Ponta et al., 2003) (Figura 4). La nomenclatura de las isoformas variables de CD44 es bastante compleja; cuando se habla de isoformas que contienen únicamente un exón variable, por ejemplo, el exón V10, la isoforma es denominada CD44v10, pero si contiene consecutivamente los exones que van del V3 al V10, la isoforma se denomina CD44v3-10. También existe la posibilidad de que la isoforma contenga varios exones no consecutivos como el V5 y el V7, entonces la nomenclatura es CD44v5,v7 (Ponta et al., 2003). Además, existe un sitio de “splicing” alternativo adicional en el exón C9, que genera una mayor variabilidad, ya que bien puede expresarse el dominio citoplasmático completo o bien puede generarse un codón de parada prematuro que hace que aparezcan isoformas con un dominio citoplasmático truncado (Screaton et al., 1992).

Estructuralmente, CD44 está compuesto por un dominio N-terminal globular, una región variable, un dominio transmembrana y un dominio citoplasmático. El dominio N-terminal está

INTRODUCCIÓN

constituido por los primeros cinco exones constantes, siendo común a todas las isoformas, y contiene motivos que funcionan como sitios de anclaje para varios componentes de la matriz extracelular. CD44 es el principal receptor del ácido hialurónico; el dominio N-terminal contiene una región de 90 aminoácidos, denominada dominio “link”, que permite tanto la unión de hialuronato como de otros glicosaminoglicanos. La afinidad de CD44 por los glicosaminoglicanos es dependiente de modificaciones post-traduccionales. Estas son específicas de las condiciones de crecimiento y el tipo celular y constituyen otra fuente de variabilidad dentro de las isoformas de CD44. Un ejemplo es la adición de heparán sulfato en la región codificada por el exón v3, lo que permite que las isoformas que contienen este exón puedan asociarse con varias proteínas de unión a heparina. El dominio N-terminal está separado de la región transmembrana por una pequeña estructura yuxtamembrana codificada por los exones variables, constituyendo la principal diferencia entre las isoformas de CD44, ya que está ausente en CD44s y varía de tamaño dependiendo de la isoforma CD44v. El dominio transmembrana de CD44 consta de 23 aminoácidos hidrofóbicos y un residuo de cisteína, y parece participar en la formación de oligómeros de CD44; además, esta región es la responsable de la localización de CD44 en lipid-rafts (Ponta et al., 2003). El dominio citoplasmático une proteínas que median la asociación de CD44 al citoesqueleto de actina, como espectrina, y proteínas de la familia ERM (ezrina, radixina, moesina), cuyas interacciones están moduladas por quinasas, como la quinasa dependiente de Rho ROCK o la proteína quinasa C (PKC) (Ponta et al., 2003).

5.2. Función biológica de CD44

CD44 participa en muchos procesos celulares, incluyendo la proliferación, la supervivencia, la diferenciación y la motilidad. Interviene también en el desarrollo neuronal, la guía de axones neurales, así como en funciones inmunes y hematopoyéticas. La alteración o pérdida de la expresión de esta familia de proteínas contribuye a numerosas patologías entre las que se encuentra el cáncer (Marhaba and Zöller, 2004). Sorprendentemente, los ratones “*Knockout*” embrionarios para CD44 presentan únicamente anomalías leves en la formación de las extremidades, en la migración de progenitores mieloides, en la colonización de la médula ósea y en la migración de los linfocitos al timo o a los nódulos linfáticos. Los fenotipos más graves se observaron tras someter a los animales a infecciones, estímulos pro-inflamatorios, inducción de la aterosclerosis, o la transformación tumoral (Protin et al., 1999). Sin embargo, la delección específica de tejido de CD44 (*knockout* condicional), por ejemplo, en la piel, parece tener efectos más evidentes, resultando en retrasos en procesos como la respuesta inflamatoria, la cicatrización de heridas y el crecimiento del pelo, así como en una disminución de la elasticidad de la piel y una respuesta reducida de la epidermis al tratamiento con agentes carcinogénicos

(Kaya et al., 1999). Estos resultados indican que la pérdida de CD44 al inicio del desarrollo embrionario posiblemente es compensada con la inducción de otros genes, que sustituyen el papel de CD44, algo que no ocurre al delecionar la proteína en el organismo adulto o en etapas más tardías del desarrollo embrionario (Ponta et al., 2003).

Además, CD44 ha sido identificado como un marcador de células madre, tanto en tejidos normales como tumorales (Zöller, 2011). El papel de CD44 en la progresión tumoral, la metástasis y la resistencia a la quimioterapia probablemente está relacionado con su función en las células madre (Morath et al., 2016).

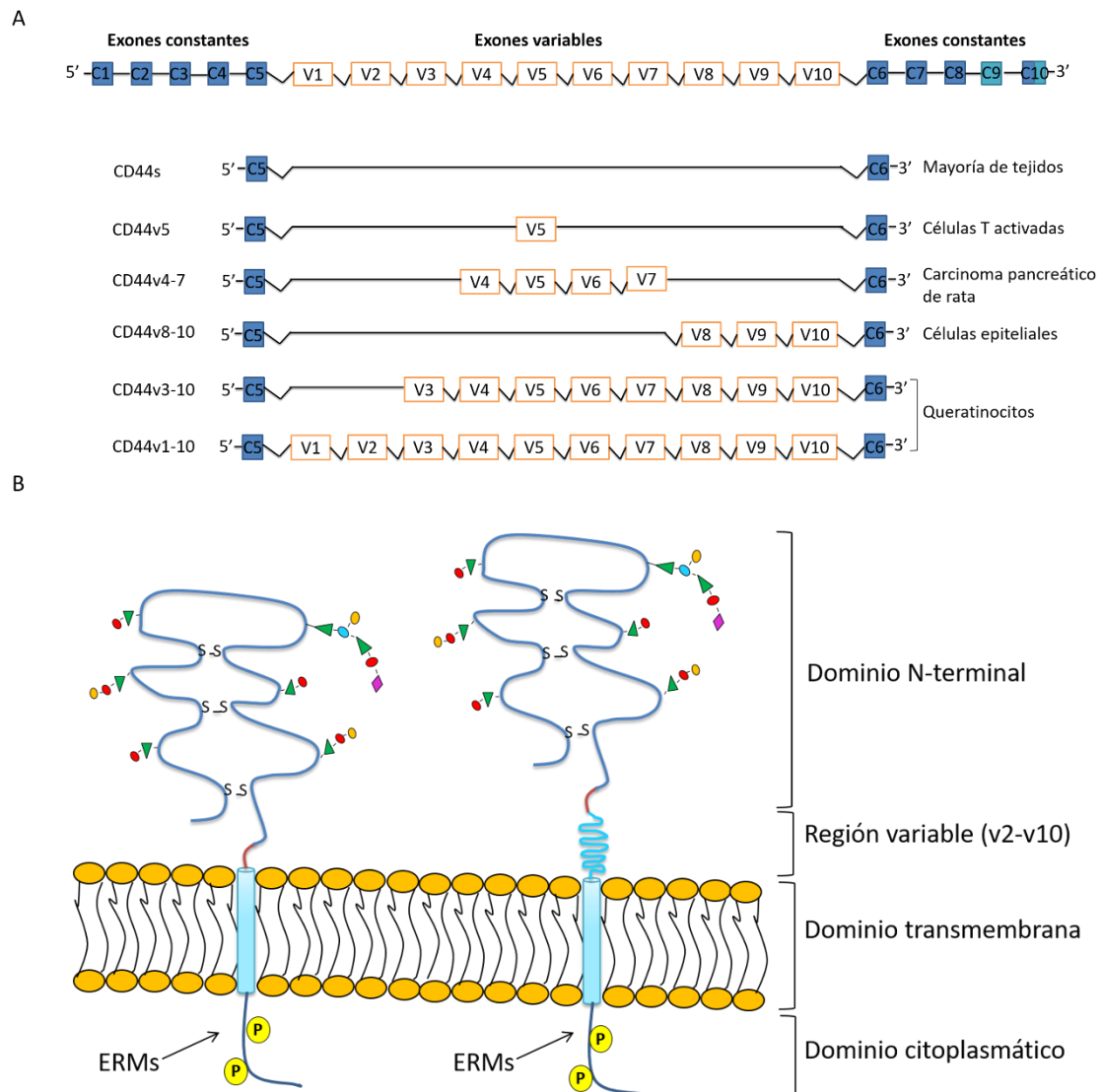


Figura 4. Esquema de la estructura de las isoformas estándar y variables de CD44. (A) Esquema del gen CD44 y de algunas isoformas que pueden generarse mediante “splicing” alternativo. Los exones constantes se representan en azul y los variables en naranja. **(B)** Esquema comparativo de la estructura proteica de la isoforma estándar de CD44 (CD44s) y una isoforma que contiene todos los exones variables (CD44v2-10), cuyas secuencias se insertan en la región yuxtamembrana denominada *stem* (rojo). En el

INTRODUCCIÓN

dominio extracelular se representan las modificaciones por glicosilación (figuras geométricas coloreadas). Adaptado de [Ponta et al., 2003](#).

Todas las funciones atribuidas a CD44 pueden explicarse considerando tres propiedades fundamentales de esta familia de proteínas. A nivel molecular, CD44 se comporta de tres formas:

- Actúa como un receptor de adhesión que interacciona con la MEC o con componentes extracelulares solubles, lo que resulta en la activación de la señalización intracelular. Por ejemplo, interacciona con componentes de la MEC, como el hialuronato, modulando la adhesión de las células a la MEC ([Ponta et al., 2003](#)), recluta metaloproteasas, como MMP9 y MMP7 ([Yu and Stamenkovic, 1999](#); [Yu et al., 2002](#)), e interacciona con osteopontina para mantener la integridad de los tejidos inflamados ([Denhardt et al., 2001](#)). Además, las isoformas que contienen el exón v3 pueden unirse a factores de crecimiento, como EGF, FGF y VEGF ([Orian-Rousseau, 2010](#)).
- Actúa como un co-receptor de receptores tirosina quinasa, y modula su activación por los ligandos y la señalización intracelular, favoreciendo la metástasis tumoral ([Orian-Rousseau and Sleeman, 2014](#)). Por ejemplo, las isoformas que contienen el exón v6 son co-receptores para la activación de c-Met ([Orian-Rousseau et al., 2002](#)). Otras isoformas de CD44 interaccionan con miembros de la familia ErbB, siendo este un evento crucial para la activación de estos receptores en carcinomas ([Bourguignon et al., 1997](#)). Además, las isoformas de CD44 pueden interaccionar mediante su dominio CT con proteínas intracelulares implicadas en varios procesos de señalización, como Src, Rho GTPasas, Rho kinasa y PKC ([Ponta et al., 2003](#)).
- Reorganiza el citoesqueleto de actina mediante su interacción con las proteínas ERM, que anclan CD44 al citoesqueleto de actina. Este es clave para mediar la señal de algunos receptores quinasa, como c-Met ([Ponta et al., 2003](#)).

5.3. Función de CD44 en el cáncer

Numerosos estudios han investigado la relevancia de las isoformas CD44s y CD44v como marcadores diagnóstico y pronóstico en tumores humanos. Aunque los resultados obtenidos son bastantes controvertidos, existen evidencias significativas de que las isoformas CD44v se sobreexpresan de manera aberrante en muchos cánceres, confiriendo a los tumores una mayor agresividad y potencial metastásico ([Prochazka et al., 2014](#)). La desregulación de los niveles de expresión de las diferentes isoformas de CD44 en la mayoría de tumores no se debe mutaciones en el gen, sino a cambios en las proteínas que controlan los patrones de expresión de CD44 a través de sus mecanismos de “splicing” alternativo ([Ponta et al., 2003](#)).

Numerosos estudios destacan el papel de las isoformas CD44v que contienen el exón variable v6 en la progresión tumoral y la metástasis. Se ha observado la expresión específica de estas isoformas en estadios avanzados de tumores de cuello cervical uterino y de páncreas asociada a un mal pronóstico (Naor et al., 1997). Además, la expresión de la isoforma CD44v4-7 (que contiene el exón v6) en una línea celular no metastásica de carcinoma pancreático de rata favorece la aparición de metástasis, mientras que la utilización de un anticuerpo anti-v6 inhibe su formación (Günthert et al., 1991). Por tanto, la señalización de las isoformas que contienen el exón v6 a través de su cooperación con Met y VEGFR2 parece tener un papel decisivo en el cáncer pancreático (Matzke-Ogi et al., 2016). En HNSCCs, la utilización de anticuerpos anti v6 disminuye la proliferación celular y aumenta la sensibilidad a cis-platino (Wang and Bourguignon, 2011). Otras isoformas ampliamente estudiadas son aquellas que contienen el exón variable v3, cuya expresión en HNSCC correlaciona con un aumento de las metástasis en nódulos linfáticos y un estadio avanzado (Wang and Bourguignon, 2011). Por último, se ha descrito que las isoformas variables que presentan el exón v10, confieren una mayor resistencia de los tumores HNSCC, cáncer de mama y cáncer renal a quimioterapia y promueven la progresión tumoral y la metástasis (Wang and Bourguignon, 2011). Estudios en el cáncer de mama demuestran que la sobreexpresión de CD44s promueve la agresividad de esos tumores y un peor pronóstico para los pacientes (Sun et al., 2017).

A pesar de la gran variedad de estudios que han centrado sus esfuerzos en determinar la asociación de las distintas isoformas de CD44 con la progresión maligna de determinados tipos de tumores, aún existe una gran controversia en este sentido, debida en gran medida por la dificultad de aislar y analizar específicamente ciertas isoformas. En muchos estudios se han utilizado anticuerpos específicos de determinados exones variables, sin llegar a profundizar en qué isoformas se expresan específicamente en sus modelos biológicos, y asumiendo que la presencia de un determinado exón variable lleva a cabo una función determinada independientemente del resto de la isoforma.

6. PODOPLANINA: UNA GLICOPROTEÍNA TRANSMEMBRANA IMPLICADA EN LA MIGRACIÓN Y LA INVASIÓN TUMORAL

6.1 Origen y estructura

Podoplanina (PDPN) es una glicoproteína transmembrana de tipo mucina que se expresa en una amplia variedad tejidos y tipos celulares, como podocitos glomerulares, células epiteliales alveolares de tipo I, osteocitos, células mesoteliales, células del plexo coroideo,

INTRODUCCIÓN

células gliales, algunos tipos de neuronas, células endoteliales linfáticas, y diferentes tipos de fibroblastos. En estos tipos celulares fue identificada de manera independiente por distintos grupos con diferentes nombres: antígeno PA2.26, OTS-8, E11, Aggrus, T1 α , gp-38, podoplanina (Astarita et al., 2012; Quintanilla et al., 2019; Renart et al., 2015). En nuestro laboratorio, se identificó a podoplanina como un antígeno reconocido por el anticuerpo monoclonal PA2.26, cuya expresión se inducía en queratinocitos de la epidermis y fibroblastos de la dermis durante la carcinogénesis química de piel de ratón. Su expresión se inducía también en estas células durante la cicatrización de heridas o tras el tratamiento de la piel con el éster de forbol TPA (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate) (Gandarillas et al., 1997; Scholl et al., 1999). Posteriormente, nuestro laboratorio clonó y caracterizó el cDNA ortólogo humano (Martín-Villar et al., 2005). Al final, el nombre que ha prevalecido es el de podoplanina, que hace referencia a la implicación de esta proteína en el aplanamiento de los podocitos (células epiteliales) del glomérulo durante la enfermedad renal (Breiteneder-Geleff et al., 1997).

Podoplanina exhibe la estructura típica de las glicoproteínas transmembrana de tipo mucina, con un dominio extracelular fuertemente O-glicosilado (con residuos de galactosa unidos a N-acetilgalactosamina, modificados, a su vez, por la adición de ácido siálico), un dominio transmembrana hidrofóbico y un dominio citoplasmático extraordinariamente corto (Figura 5). El dominio extracelular es la región de la molécula menos conservada evolutivamente (Renart et al., 2018) y presenta cuatro motivos repetidos en tándem, denominados PLAG 1-4, que son clave para la interacción de podoplanina con el receptor tipo lectina CLEC-2, presente en la superficie de otros tipos celulares como plaquetas, células dendríticas o algunos tipos de macrófagos (Suzuki-Inoue et al., 2017). El dominio extracelular también es el responsable de la interacción de podoplanina con otras proteínas como galectina-8, HSPA9 y CCL21 (revisado en (Quintanilla et al., 2019)). El dominio transmembrana (y el citoplasmático) está muy conservado evolutivamente, particularmente una región N-terminal que contienen un motivo GXXXG implicado en la oligomerización hélice-hélice de la proteína y en la asociación de podoplanina con balsas lipídicas ("lipid-rafts") (Fernández-Muñoz et al., 2011). Este dominio puede sufrir un corte proteolítico por la proteasa intramembrana presenilina-1/ γ -secretasa, liberando el dominio intracelular al citosol (Yurrita et al., 2014). La relevancia funcional de este hecho es desconocida. El dominio citosólico, compuesto por sólo nueve aminoácidos (RKMSGRYSP, en humanos), contiene un grupo yuxtamembrana de aminoácido básicos (RK...R) responsable de la interacción de podoplanina con proteínas ERM y de su anclaje al citoesqueleto de actina. Además, este dominio tiene dos residuos Ser que son sitios potenciales de fosforilación por la

acción concertada de las quinasas PKA y CDK5, que podrían modular la función pro-migratoria de podoplanina ([Krishnan et al., 2015](#)).

6.2. Interacción de podoplanina con otras proteínas

Podoplanina carece de dominios enzimáticos obvios ([Figura 5](#)) por lo que debe realizar sus funciones a través de interacciones con otras proteínas. Son varias las moléculas que, hasta la fecha, forman parte del interactoma asociado a podoplanina, y que ayudan a explicar los efectos biológicos y patológicos de esta glicoproteína.

Como se ha mencionado anteriormente, podoplanina interacciona (a través de los motivos PLAG de su dominio extracelular) con el receptor CLEC-2 tipo lectina situado en la superficie de las plaquetas. Mediante esta interacción, podoplanina induce la agregación y activación plaquetaria, un evento implicado en distintos procesos biológicos, como la separación de la vasculatura linfática de la sanguínea durante el desarrollo embrionario y la metástasis tumoral (como veremos más adelante). CLEC-2 también se expresa en diferentes células del sistema inmune y la interacción podoplanina-CLEC-2 tiene un papel clave en la biogénesis plaquetaria que ocurre en la médula ósea y en la respuesta inmune ([Suzuki-Inoue et al., 2017](#)).

Podoplanina interacciona también mediante su dominio extracelular con la lectina galectina-8, un componente de la MEC implicado en la regulación de la angiogénesis y la linfangiogénesis ([Cueni and Detmar, 2009](#)). Tanto podoplanina como galectina-8 se expresan abundantemente en células endoteliales linfáticas y la interacción podoplanina-galectina-8, además de promover la adhesión y migración de las células endoteliales linfáticas, parece estar implicada en la linfangiogénesis inflamatoria ([Chen et al., 2016](#)). Este dominio también es el responsable de la interacción de la proteína extracelular de choque térmico A9 (HSPA9) con podoplanina en la superficie de células de SCC oral ([Tsuneki et al., 2013](#)). Aunque se ha descrito que HSPA9 (también conocida como mortalina) está implicada en la carcinogénesis, la respuesta al estrés y la neurodegeneración ([Flachbartová and Kovacech, 2013](#)), se desconoce la relevancia de la interacción podoplanina-HSPA9 en estos procesos. Por último, el dominio extracelular de podoplanina interacciona con la quimiocina CCL21 específica del sistema linfático y a dicha interacción se le ha implicado en el desarrollo de células T especializadas, en la respuesta inmune y en la evasión de las células tumorales de la vigilancia del sistema inmunitario (revisado en ([Quintanilla et al., 2019](#))).

INTRODUCCIÓN

Podoplanina interacciona mediante su dominio transmembrana con tetraspanina CD9 en dominios específicos de la membrana, denominados microdominios enriquecidos en tetraspaninas. La interacción podoplanina-CD9 en células de fibrosarcoma bloquea la agregación plaquetaria inducida por podoplanina e inhibe la metástasis (Nakazawa et al., 2008). Recientemente, se ha descrito también una función de la interacción podoplanina-CD9 en células reticulares fibroblásticas implicada en la respuesta inmune (Winde et al., 2019).

Como se ha mencionado anteriormente, podoplanina interacciona con los miembros de la familia ERM ezrina y moesina, a través de tres residuos básicos (RK...R) de su dominio citoplasmático. Esta interacción es clave para el anclaje de podoplanina al citoesqueleto de actina y para la función pro-migratoria y pro-invasiva de esta molécula (Martín-Villar et al., 2006, 2005; Scholl et al., 1999), como veremos más adelante (Figura 5).

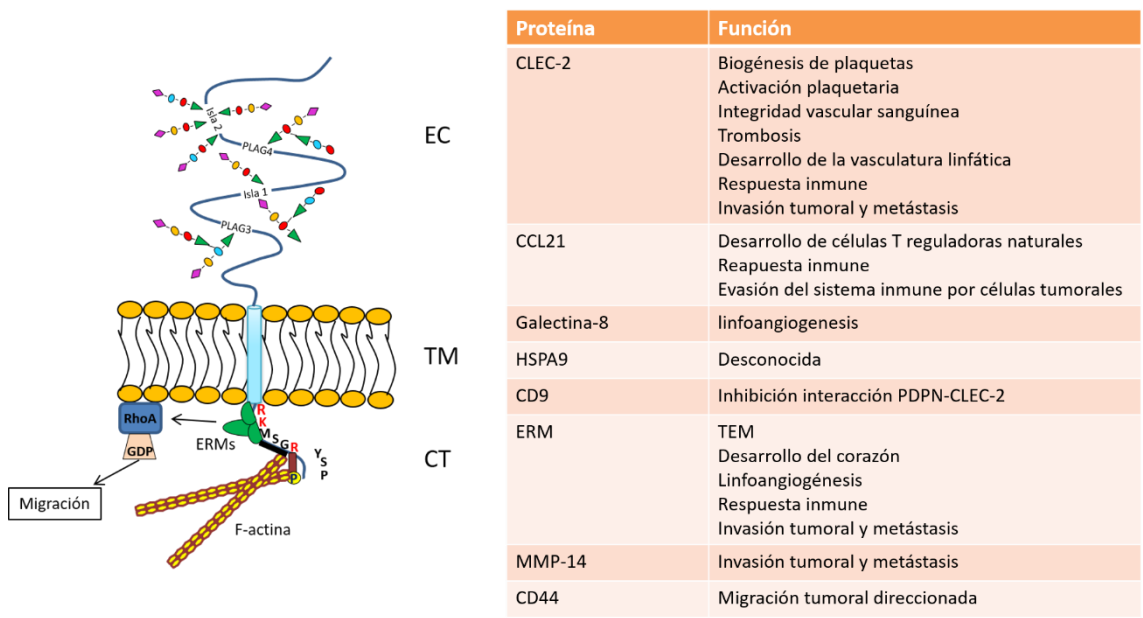


Figura 5: Estructura de podoplanina y ligandos biológicos. Se incluye la secuencia de aminoácidos del dominio citosólico (CT) y la interacción con proteínas ERM a través de los aminoácidos básicos (rojo) que anclan la proteína al citoesqueleto de actina. En el dominio extracelular (EC) se representan los motivos PLAG implicados en la unión a la proteína CLEC-2 y las regiones de aminoácidos (isla 1 e isla 2) cuya glicosilación (figuras geométricas coloreadas) es relevante para la interacción de podoplanina con CD44, como se demuestra en esta tesis. TM, dominio transmembrana. En la Tabla de la derecha se describen los ligandos que interaccionan con podoplanina y las funciones biológicas en las que están implicadas estas interacciones.

Finalmente, se ha descrito que podoplanina y la proteasa de membrana MT1-MMP forman un complejo en la superficie de células de SCC, una interacción que podría estar implicada en la invasión tumoral (Li et al., 2015). Por otro lado, en el año 2010, nuestro laboratorio describió la interacción de podoplanina con la isoforma CD44s en la superficie de células SCC. Mediante técnicas de microscopía y transferencia de energía de resonancia fluorescente (FRET-FLIM) en

células vivas, pudimos comprobar que esta interacción ocurre fundamentalmente en células SCC individuales que están migrando o en los lamelipodios del frente de migración de células que se mueven de manera colectiva, y desaparece en los contactos célula-célula, a pesar de que la expresión y co-localización de ambas proteínas en estas regiones es muy abundante. La interacción podoplanina-CD44s parece ser crítica para una migración eficiente y direccional de las células de carcinoma ([Martín-Villar et al., 2010](#)).

6.3. Función de podoplanina en cáncer

La expresión de podoplanina aumenta en una gran variedad de cánceres, como mesoteliomas malignos, tumores germinales, astrocitomas, glioblastomas y SCCs de diversos orígenes (cavidad oral, faringe, piel, esófago y pulmón). En estos tumores, podoplanina se localiza, generalmente, en el frente invasivo. Aunque en algunos casos la expresión de podoplanina se considera un factor de buen pronóstico (carcinoma cervical uterino y SCC de pulmón), en la mayoría de los tumores podoplanina se asocia con la progresión maligna y la metástasis ([Renart et al., 2015](#)). Podoplanina se expresa también en células del estroma, principalmente en fibroblastos activados (CAFs), sin embargo, el valor pronóstico de su presencia en CAFs es controvertido, estando en algunos casos asociado a una supervivencia más corta y un peor pronóstico, y, en otros, a un pronóstico favorable ([Quintanilla et al., 2019](#)).

La expresión de podoplanina en las células tumorales tiene varios efectos sobre la progresión maligna. Por un lado, la interacción de podoplanina localizada en la superficie de las células tumorales con CLEC-2 en la superficie de las plaquetas promueve la agregación y la activación plaquetaria, protegiendo a las células tumorales circulantes, tanto del estrés mecánico al que se ven sometidas al circular por el torrente sanguíneo, como del ataque por las células del sistema inmune, lo que favorece su supervivencia de las células tumorales en el torrente sanguíneo ([Kunita et al., 2007](#)). Las plaquetas promueven, asimismo, la adhesión de las células tumorales al endotelio sanguíneo y, por tanto, favorecen la embolización de la microvasculatura y la extravasación de estas células. Además, las plaquetas activadas secretan una gran variedad de factores y quimiocinas que promueven la proliferación y migración de las células tumorales ([Suzuki-Inoue, 2011](#)). Mediante este mecanismo podoplanina facilita la metástasis de las células tumorales que lo expresan.

Por otro lado, podoplanina tiene funciones tanto pro-migratorias como pro-invasivas. Así, a través de su interacción con las proteínas de la familia ERM, promueve la migración celular ([Martín-Villar et al., 2006](#)). Nuestro laboratorio ha demostrado, además, que podoplanina induce una TEM parcial o completa en queratinocitos premalignos y células MDCK ([Martín-Villar](#)

INTRODUCCIÓN

et al., 2006, 2005; Scholl et al., 2000, 1999), asociadas con una mayor motilidad y capacidad invasiva, tumorigenica y metastásica. La interacción con ezrina y/o moesina es clave para que podoplanina promueva la activación de RhoA GTPasa y su quinasa ROCK, lo que conduce a una reorganización del citoesqueleto, la estimulación de la motilidad y, en determinadas circunstancias, a una reprogramación génica que conduce a la TEM (Martín-Villar et al., 2006). Es interesante señalar que, aunque en muchos tumores podoplanina co-localiza con E-cadherina en los contactos célula-célula del frente invasivo (Wicki et al., 2006), se han observado casos de tumores en los que la expresión de podoplanina correlaciona con la pérdida de E-cadherina (Cho et al., 2017; Martín-Villar et al., 2006). Estos datos sugieren que la expresión de podoplanina en los tumores *in vivo* puede debilitar los contactos célula-célula y promover, tanto la migración colectiva (Wicki et al., 2006) como la migración individual de las células tumorales (Martín-Villar et al., 2006).

Las células tumorales también pueden secretar podoplanina al medio extracelular incorporada en la membrana de microvesículas y exosomas. Los exosomas que contienen podoplanina promueven tanto la angiogénesis como la linfangiogénesis, aunque sólo esta última es dependiente de la presencia de podoplanina en la superficie de estas vesículas. Un análisis proteómico realizado en el curso de estos estudios reveló que podoplanina promueve la incorporación a exosomas de proteínas implicadas en el tráfico vesicular y favorece la producción y liberación de vesículas extracelulares (Carrasco-Ramírez et al., 2016).

Finalmente, podoplanina es un importante componente de los invadopodios de células de SCCs (Hwang et al., 2012; Martín-Villar et al., 2015). Los análisis de inmunofluorescencia y microscopía confocal realizados por nuestro laboratorio localizan a podoplanina en el anillo de adhesión de estas estructuras, junto con vinculina y paxilina. La asociación de podoplanina a los invadopodios es muy dinámica. Su reclutamiento a estas estructuras es dependiente de su localización en balsas lipídicas (mediado por el dominio transmembrana y, concretamente, el motivo GXXXG de oligomerización de esta glicoproteína) y su localización en el anillo de adhesión es dependiente de su interacción con proteínas ERM, que conectan a podoplanina con F-actina. Los estudios funcionales realizados sugieren que podoplanina no está implicada en la formación de los invadopodios, sino en su estabilización, mediante la activación de la ruta RhoC-ROCK-LIMK-cofilina, y en promover una degradación eficiente de la MEC (Martín-Villar et al., 2015). Es importante señalar que CD44s ha sido identificado también como un componente de invadopodios en células de cáncer de mama y de glioblastomas (Petropoulos et al., 2018; Zhao et al., 2016).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los estudios previos de nuestro laboratorio habían demostrado una interacción de podoplanina con la isoforma CD44s, y que esta interacción estaba relacionada funcionalmente con la migración de células SCC. Sin embargo, hasta la realización de esta tesis, se desconocía si podoplanina interaccionaba también con isoformas CD44v. Por otro lado, estudios de distintos laboratorios, incluido el nuestro, habían identificado a podoplanina y CD44s como componentes de los invadopodios. En esta tesis, hemos abordado el estudio de la posible interacción de podoplanina con CD44v y, una vez confirmada esta, hemos analizado la localización de CD44s y CD44v en los invadopodios. La hipótesis de trabajo aquí planteada ha sido que la interacción de podoplanina, tanto con CD44s como con CD44v, es relevante para la función de estas estructuras y para la invasión de células de SCC a través de la membrana basal.

OBJETIVOS

1. Analizar la posible expresión conjunta de podoplanina con CD44s y CD44v *in vivo* e *in vitro*.
 - 1.1. Analizar la expresión de podoplanina y CD44 (CD44s y CD44v) en la piel de ratón tras un estímulo pro-inflamatorio con TPA.
 - 1.2. Analizar la expresión de podoplanina y CD44 (CD44s y CD44v) en líneas celulares representativas de distintos estadios de la carcinogénesis química de piel de ratón.
 - 1.3. Analizar la expresión de podoplanina y CD44 en líneas celulares humanas de SCC. Identificar las isoformas CD44v que se co-expresan con podoplanina.
2. Analizar la posible interacción de podoplanina con CD44s y las isoformas CD44v identificadas en el objetivo anterior y caracterizar los dominios estructurales de podoplanina implicados en la interacción.
3. Estudiar la relevancia de la interacción podoplanina-CD44 (CD44s y CD44v) en la formación de invadopodios activos y en la invasión de células SCC a través de la membrana basal.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. CLONAJES Y CONSTRUCCIONES DE DNA

En este trabajo se han aislado diferentes isoformas de CD44 expresadas en líneas celulares humanas de SCCs y se han clonado en los vectores de expresión pcDNA3-Ha, pEGFP-N1, pmCherry-N1 y en el vector lentiviral pLNT-SFFV. Para ello, se amplificó el cDNA de CD44 de las líneas celulares HT1080, HN5 y A253 usando los cebadores descritos en la [Tabla 1](#) y la enzima de alta precisión Phusion High-fidelity DNA polymerase (New England Biolabs). Los cDNAs de las distintas isoformas se aislaron empleando un kit de extracción de DNA en gel (Nzytech) y se insertaron en los vectores utilizando las enzimas de restricción indicadas en la [Tabla 1](#). La construcción CD44v6-eGFP no pudo conseguirse utilizando este sistema debido al bajo nivel de expresión de esta isoforma en las líneas celulares, y se clonó empleando el kit in-fusion® HD cloning (Clontech), que permite una mayor eficiencia de clonaje, utilizando cebadores específicos para este sistema ([Tabla 1](#)).

Para la obtención de construcciones de podoplanina silvestre y mutantes fusionadas con Flag se utilizaron distintos procedimientos. PDPN-ΔEC, PDPN-TMCD45, PDPN, PDPN-G137L, PDPN-ΔCT y PDPN-QN.N se clonaron a partir de los cDNAs fusionados a eGFP ([Martín-Villar et al., 2006](#)), empleando la enzima Phusion High-fidelity DNA polymerase (New England Biolabs) y oligos específicos que se describen en la [Tabla 2](#). Las construcciones mutantes PDPNΔEC-QN.N, PDPN-S/Tm, PDPN-PLAG3m, PDPNΔPLAG3, PDPN-TMSYN, PDPN-TMGPA, PDPN-TMERBB2, PDPN-PLAG3S/Tm, PDPN-PLAG4S/Tm, PDPN-I1S/Tm y PDPN-I2S/Tm se generaron por mutagénesis dirigida de la secuencia de PDPN silvestre, mediante el protocolo descrito en Zheng y colaboradores ([Zheng et al., 2004](#)). Este método consiste en introducir en la secuencia de podoplanina clonada en el plásmido pcDNA3-Flag una mutación a través de un proceso de elongación mediante una única PCR (16 ciclos: 1 min a 94°C, 1 min a 52°C y 8-24 min a 68°C, seguido de una incubación de 1h a 68°C), utilizando la enzima Expand™ High-Fidelity (Roche), con una pareja de cebadores complementarios ([Tabla 2](#)) que cumplen los siguientes requisitos: tener una longitud de 25-45pb y una $T_m > 78^\circ\text{C}$ y contener la mutación de interés.

Todas las construcciones generadas en el laboratorio fueron secuenciadas en el servicio de genómica del IIBM.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 1. Construcciones de DNA de las isoformas de CD44 generadas en esta tesis.

Construcción	Procedencia cDNA	Cebador	Dianas de restricción	Plásmidos
CD44sHa	HT1080	5' CCGTTCGCTCGAATTC CATGGACAAGTTT 3' 5' AAGATAATGGTGTAGCTCGAGCACCCCAATCTTCAT 3'	EcoRI XhoI	pcDNA3-Ha
CD44v3-10-Ha	A253	5' CCGTTCGCTCGAATTC CATGGACAAGTTT 3' 5' AAGATAATGGTGTAGCTCGAGCACCCCAATCTTCAT 3'	EcoRI XhoI	pcDNA3-Ha
CD44v6-10-Ha	HN5	5' CCGTTCGCTCGAATTC CATGGACAAGTTT 3' 5' AAGATAATGGTGTAGCTCGAGCACCCCAATCTTCAT 3'	EcoRI XhoI	pcDNA3-Ha
CD44v8-10-Ha	HN5	5' CCGTTCGCTCGAATTC CATGGACAAGTTT 3' 5' AAGATAATGGTGTAGCTCGAGCACCCCAATCTTCAT 3'	EcoRI XhoI	pcDNA3-Ha
CD44sC9-Ha	HN5	5' CCGTTCGCTCGAATTC CATGGACAAGTTT 3' 5' ACCTGAATCCTCGAGACTTCTCGACTGTTGAC 3'	EcoRI xhoI	pcDNA3-Ha
CD44s-eGFP	HT1080	5' CCGTTCGCTCGAATTC CATGGACAAGTTT 3' 5' ATAATGGTGTAGGGGTACCAACCCCAATCTTCAT 3'	EcoRI KpnI	pEGFP-N1
CD44v3-10-eGFP	A253	5' CCGTTCGCTCGAATTC CATGGACAAGTTT 3' 5' ATAATGGTGTAGGGGTACCAACCCCAATCTTCAT 3'	EcoRI KpnI	pEGFP-N1
CD44v6-10-eGFP	HN5	5' CTCAAGCTTCAGATCTCCATGGACAAGTTTGGTGGCAC 3' 5' GATCCCGGGCCCGCGTACCCCAACCCCAATCTTCATGTCCAC 3'	EcoRI KpnI	pEGFP-N1
CD44v8-10-eGFP	HN5	5' CCGTTCGCTCGAATTC CATGGACAAGTTT 3' 5' ATAATGGTGTAGGGGTACCAACCCCAATCTTCAT 3'	EcoRI KpnI	pEGFP-N1
CD44sC9-eGFP	HN5	5' CCGTTCGCTCGAATTC CATGGACAAGTTT 3' 5' ACCTGAAGGTACCAACTTCTCGACTGTTGAC 3'	EcoRI KpnI	pEGFP-N1
CD44s-mCherry	CD44s-eGFP	-----	EcoRI KpnI	pmCherry-N1
CD44s-eGFP-pLNT	CD44s-eGFP	5' CTCAAGCTTCAGATCTCCATGGACAAGTTT 3' 5' TGATCTAGAGTCGCGACGCGTTTACTTGTA 3'	BamHI BglII MluI	pLNT-SFFV
CD44v3-10-eGFP-pLNT	v3-10-eGFP	5' CTCAAGCTTCAGATCTCCATGGACAAGTTT 3' 5' TGATCTAGAGTCGCGACGCGTTTACTTGTA 3'	BamHI BglII MluI	pLNT
CD44V8-10-eGFP-pLNT	v8-10-eGFP	5' CTCAAGCTTCAGATCTCCATGGACAAGTTT 3' 5' TGATCTAGAGTCGCGACGCGTTTACTTGTA 3'	BamHI BglII MluI	pLNT

Para visualizar la dinámica del citoesqueleto de actina en la célula viva, se empleó un péptido de 17 aa con alta afinidad por F-actina denominado Lifeact. Este péptido estaba fusionado a eGFP o a Rubby, según se indica en los experimentos correspondientes. Las construcciones que contienen estos cDNAs han sido descritas previamente ([Scales et al., 2013](#)) y fueron cedidas por la Profesora Maddy Parsons del King's College London (Reino Unido).

Tabla 2. Construcciones de DNA de podoplanina en su forma silvestre y mutada.

Construcción	Procedencia cDNA	Cebador	Dianas de restricción	Plásmidos
PDPN-mCherry	PDPN-eGFP	-	EcoRI KpnI	Pmcherry-N1
PDPN-Flag	pcDNA3-PDPN (Martín-Villar et al., 2005)	5' AGCTTCGAATCCCCGATGTGG 3' 5' TTGCTCACCTCGAGGGCGAC 3'	EcoRI XhoI	pcDNA3-Flag
PDPN-ΔEC-Flag	PDPN-ΔEC-eGFP (Martín-Villar et al., 2006)	5' CGTCAGATCGGTACCCATGTGG 3' 5' TTGAGCGAATCTCTGAGTCCGGA3' 5' ATGGTTTGAATTCGTGACCCTGGTT 3' 5' TTCAGCCTCGAGGGGCGAGTACCT 3'	KpnI EcoRI EcoRI XhoI	pcDNA3-Flag
PDPN-ΔEC QN.N-Flag	pcDNA3-PDPN ΔEC-Flag	QN 5' GTTATGCAAAACATGTCGGGAAGGTAC 3' 5' GTTTTGACATGCATAACCACAACGATG 3' N 5' GGAACTACTCGCCCTCG 3' 5' GAGTAGTTTCCCGACATGTTTG 3'	-	pcDNA3-Flag
PDPN-S/Tm-Flag	pcDNA3-PDPNFlag	5' AGCTTCGAATCCCCGATGTGG 3' 5' TTGCTCACCTCGAGGGCGAC 3'	EcoRI XhoI	pcDNA3-Flag
PDPN-PLAG3m-Flag	pcDNA3-PDPNFlag	5' GTGCCGCGAGCTGATGTGGTGGCTCCAGGAACCAGC 3' 5' CTGGAGCCACCACATCAGCTGCGGCACCTGGCATGG 3'	-	pcDNA3-Flag
PDPN-ΔPLAG3-Flag	pcDNA3-PDPNFlag	5' GGTGCCACCAGCGAAGACCGCTATAAG 3' 5' CGCTGGTGGCACCTGGCATGGC 3'	-	pcDNA3-Flag
PDPN-TMCD45-Flag	PDPN-TMCD45-eGFP (Fernández-Muñoz et al., 2011)	5' AGCTTCGAATCCCCGATGTGG 3' 5' TTGCTCACCTCGAGGGCGAC 3'	EcoRI XhoI	pcDNA3-Flag
PDPN-TMSYN-Flag	pcDNA3-PDPN-Flag	5'TACTACGTCGACAATGATGATCATCTTGGGAGTGATTTGC3' 5'TACTACTCCGGACATTTTTCGGAAGTAACTATGATGATGATGA TGAGG3'	-	pcDNA3-Flag
PDPN-TMGPA-Flag	pcDNA3-PDPN-Flag	5' TACTACGTCGACAATAACACTCATTATTTTGG 3' 5' TACTACTCCGGACATTTTTCGAATACCGTAAGAAATT AAGAGG 3'	-	pcDNA3-Flag
PDPN-G137L-Flag	PDPN-G137L-eGFP (Fernández-Muñoz et al., 2011)	5' AGCTTCGAATCCCCGATGTGG 3' 5' TTGCTCACCTCGAGGGCGAC 3'	EcoRI XhoI	pcDNA3-Flag
PDPN-ΔCT-Flag	PDPN-ΔCTeGFP (Martín-Villar et al., 2006)	5' AGCTTCGAATCCCCGATGTGG 3' 5' TTGCTCACCTCGAGGGCGAC 3'	EcoRI XhoI	pcDNA3-Flag
PDPN-QN.N-Flag	PDPN-QNN-eGFP (Martín-Villar et al., 2006)	5' AGCTTCGAATCCCCGATGTGG 3' 5' TTGCTCACCTCGAGGGCGAC 3'	EcoRI XhoI	pcDNA3-Flag
PDPN-PLAG3S/Tm-Flag	pcDNA3-PDPN-Flag	5' GGTGGCTCCAGGAACCAG 3' 5' GGAGCCACCACATCATC 3'	-	pcDNA3-Flag

MATERIALES Y MÉTODOS

PDPN- PLAG4S/Tm- Flag	pcDNA3- PDPN-Flag	5' GCCAGCTTCAGAAAGCAC 3' 5' GAAGCTGGCAGATCCTC 3'	-	pcDNA3- Flag
PDPN- I1S/Tm-Flag	pcDNA3- PDPN-Flag	T65-T66 5' CTTGGCAGCTCTGGTGGCAAC 3' 5' CAGAGCTGCCAAGCCAGACTTATAG 3' T70-T76 5' GGCAGCAGCTGTCAACGCTGTAGCAGGCATTTCGCA TC3' 5' CCTGCTACAGCGTTGACAGCTGCTGCCACCAGAGC 3'	-	pcDNA3- Flag
PDPN- I2S/Tm-Flag	pcDNA3- PDPN-Flag	S98-T100 5' GTCCAGCCGCCGAGCCTCAAACG 3' 5' GCTGCGGCGGTGGACTTTGTTCTTG 3' S107-T110 5' CACCGCTCACGCCGCGAGAAAGTGGATG 3' 5' CTCCGCGCGTGAGCGGTGGCCACGTTTG 3'	-	pcDNA3- Flag

2. ANTICUERPOS

Los diferentes anticuerpos primarios y secundarios utilizados en esta tesis se describen en las [Tablas 3 y 4](#).

Tabla 3. Anticuerpos primarios utilizados en esta tesis.

Anticuerpo	Especie		Aplicación			Procedencia
	Monoclonal	Policlonal	WB	IF	IP	
Anti-CD44 humano/ratón (HP2/9)	Ratón		1:8000			Dr. F. Sánchez-Madrid
Anti-CD44 humano/ratón (IM-7)	Rata		1:100	1:50		Dra. H. Yarwood
Anti-CD44 ratón (KM-201)	Rata		1:100	1:50		Dra. H. Yarwood
Anti-CD44 humano (E1.2/8)	Ratón		1:100			Dra. H. Yarwood
Anti-podoplanina humana (NZ-1)	Rata		1:1000			Acris
Anti-podoplanina ratón (PA2.26)	Rata		1:100			Producido en nuestro laboratorio
Anti-Ha	Rata		1:1000			Roche
Anti-Flag	Ratón				1µg	Sigma-Aldrich
Anti-eGFP	Rata		1:1000			MBL international
Anti-laminina V		Conejo		1:500		Dako
Anti-GAPDH	Ratón		1:10000			Milipore
Anti-tubulina	Ratón		1:10000			Sigma-Aldrich

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados en esta tesis.

Anticuerpos conjugados	Especie	Aplicación		Procedencia
		WB	IF	
Anti-ratón HRP	Oveja	1:2000		Amersham
Anti-rata HRP	Cabra	1:5000		Santa Cruz Biotechnology
Anti-rata HRP	Cabra	1:5000		Invitrogen
Anti-conejo HRP	Burro	1:5000		Amersham
Anti-rata Alexa 488	Cabra		1:200	Molecular Probes
Anti-ratón Alexa 488	Cabra		1:200	Molecular Probes
Anti-conejo Alexa 546	Cabra		1:200	Molecular Probes

3. MÉTODOS DE CULTIVO CELULAR

3.1 Cultivos celulares

En este trabajo se han utilizado diferentes líneas celulares. Hemos utilizado líneas celulares representativas de diferentes estadios del modelo de carcinogénesis química en piel de ratón, cuyas características y medios de cultivos se describen en la [Tabla 5](#). También se ha utilizado un panel de líneas humanas de SCCs cuyo origen y medios de cultivo figuran en la [Tabla 6](#). En todos los casos, el medio se suplementó con suero fetal bovino (FBS) al 10% (salvo la línea celular HN5 que se suplementó con FBS al 5% y la línea SCC13 que se suplementó con extracto de pituitaria de rata y EGF) y glutamina (2 mM). Para las líneas celulares murinas se utilizaron como antibióticos gentamicina (32 µg/ml) y ampicilina (100 µg/ml), mientras que para las líneas humanas se emplearon penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml). Todas las líneas celulares se mantuvieron a 37°C, en atmósfera húmeda con un 5% de CO₂.

Tabla 5. Líneas celulares derivadas del modelo de carcinogénesis química en piel de ratón.

Línea celular	Origen	Mutaciones	Fenotipo	Medio cultivo	Referencia
MCA3D	Queratinocitos primarios tratados con DMBA y Ca ²⁺	-	E	Hams'F12	(Kulesz-Martin et al., 1983)
PB	Papiloma inducido con DMBA/TPA	-	E	Hams'F12	(Yuspa et al., 1986)
PDV	Queratinocitos primarios transformados con DMBA	-	E	Hams'F12	(Fusenig et al., 1978)
MSC11B9	Carcinoma inducido con DMBA/TPA	H-ras; p53	E	DMEM	(Burns et al., 1991)
MSC11A5	Carcinoma inducido con DMBA/TPA	H-ras; p53	F	DMEM	(Burns et al., 1991)
CarcC	Carcinoma inducido con DMBA/TPA	H-ras	F	DMEM	(Buchmann et al., 1991)
CarB	Carcinoma inducido con DMBA/TPA	H-ras	F	DMEM	(Buchmann et al., 1991)

Tabla 6. Líneas celulares humanas empleadas en este trabajo.

Línea celular	Origen	Medio de Cultivo
HaCaT	Queratinocitos normales inmortalizados	DMEM
HN30	Carcinoma escamoso de la faringe	DMEM
HN19	Metástasis de SCC en el nódulo linfático	DMEM
A253	Carcinoma epidermoide glándula salivar submaxilar	DMEM
Fadu	Carcinoma escamoso de la faringe	DMEM
SCC13	Carcinoma escamoso de la epidermis facial	Keratinocyte-SFM
HEK293T	Células embrionarias de riñon humanas	DMEM
HN5	Carcinoma escamoso de lengua	DMEM
HN5CD44sGFP	Línea HN5 infectada con vector lentiviral CD44s-GFP	DMEM
HN5v3-10GFP	Línea HN5 infectada con vector lentiviral CD44v3-10GFP	DMEM
HN5v8-10GFP	Línea HN5 infectada con vector lentiviral CD44v8-10GFP	DMEM

3.2 Transfecciones transitorias

Las contrucciones de CD44 y podoplanina fusionadas a los epítomos epítomos Ha, Flag o eGFP que se describen en las [Tablas 1 y 2](#), se transfectaron de forma transitoria en células HEK293T. Para ello, 7×10^5 células se sembraron en placas de 60mm hasta alcanzar una confluencia en torno al 60%. Al día siguiente, las células se transfectaron con $1 \mu\text{g}$ de las distintas construcciones utilizando como agentes Eugene 6 (Promega) o Lipofectamina 2000 (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Al cabo de 24h, las células se lisaron para los experimentos de Western blot o inmunoprecipitación ([apartados 6.1 y 6.2](#)) o se sembraron sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro para los experimentos de inmunofluorescencia ([apartado 8.1](#)).

3.3 Infección con lentivirus

Para las infecciones lentivirales, se utilizaron las construcciones de CD44 fusionadas a la proteína eGFP y clonadas en el vector pLNT-SFFV, así como construcciones de Lifeact-GFP/Rubby clonadas también en el vector pLNT-SFFV ([Tabla 1](#)). Las células HEK293T se transfectaron con $1 \mu\text{g}$ de plásmido lentiviral, 750 ng del plásmido de empaquetamiento psPAX2 y 250 ng del plásmido de la cápside viral pMD2.G, en medio Optimem. El medio de las células se renovó 12h tras la transfección, y los sobrenadantes con partículas virales se recogieron en dos tandas, primero después de 24h y tras añadir medio fresco, a las 48h. Los medios con partículas virales se guardaron a 4°C para su uso inmediato o se almacenaron a -80°C para su uso a largo plazo. Las infecciones de las células con las partículas virales se realizaron con bromuro de hexadimetireno (polibreno; Sigma-Aldrich) a una concentración de $8 \mu\text{g/ml}$ y 0,5-1 ml de los sobrenadantes. La eficiencia de la infección se monitorizó mediante microscopía observando la fluorescencia.

3.4 Interferencia de RNA

Los experimentos de interferencia transitoria de la expresión de podoplanina y/o CD44 se realizaron mediante tratamiento de las células HN5 con los siRNAs descritos en la [Tabla 7](#). En los experimentos de degradación de gelatina, se utilizó una mezcla de los dos siRNAs descritos en la [Tabla 7](#) para cada proteína, mientras que en los ensayos de rescate de la degradación anómala de la gelatina se utilizó únicamente el siCD44-1 para silenciar la expresión de CD44. Los siRNAs, a una concentración final de 50 nM, se transfectaron con oligofectamina (Invitrogen) a una concentración de 100µM, en medio Opti-MEM. Como control se utilizó MISSION® siRNA Universal Negative Control (Sigma-Aldrich) a una concentración final de 50 nM. Las células se incubaron a 37°C durante 6h antes de añadir FBS al 10%. Todos los ensayos se realizaron 4 días después de la transfección.

Tabla 7. Secuencias de los siRNAs empleados para la interferencia de RNA.

siRNA	Secuencia
PDPN 1	5' GAAAGACCGUUCACCAGAC 3'
PDPN 2	5' CUAACACUGGACCAUUGGA 3'
CD44 1	5' TGTGCTACTGATTGTTTCA 3'
CD44 2	5' GAACGAATCCTGAAGACATCT 3'

4. ANÁLISIS DE RNA

4.1 Extracción de RNA total

La extracción de RNA de las distintas líneas celulares tanto murinas como humanas se realizó empleando el kit RNeasy® Mini Kit (Qiagen), y las concentraciones de RNA obtenidas se cuantificaron mediante espectrofotometría (Nanodrop).

4.2 RT-PCR

Para la síntesis de cDNA se retrotranscribieron 2µg de RNA total mediante el uso de la enzima MLV-RT (Promega) y un oligo dT como cebador durante 2h a 37°C. Posteriormente, la amplificación de los cDNAs de podoplanina, CD44 y GAPDH en líneas celulares humanas y murinas se realizó utilizando los cebadores descritos en la [Tabla 8](#).

Las diferentes isoformas de CD44 se separaron mediante electroforesis en geles de Agarosa al 1% y fueron aisladas utilizando el Kit *QIAquick® extraction Kit* (Qiagen). La caracterización de los exones variables de CD44 se llevó a cabo siguiendo el protocolo desarrollado por König y colaboradores ([König et al., 1996](#)). En primer lugar, se amplificaron todas las isoformas utilizando el par de cebadores hs3 y hs5 ([Tabla 8](#)). Posteriormente, el producto de PCR obtenido se re-

MATERIALES Y MÉTODOS

amplificó empleando cebadores específicos de cada uno de los exones variables de CD44. Todas las amplificaciones se realizaron mediante reacción de PCR (35 ciclos: 30s a 90°C, 1 min a 57°C y 3 min a 72°C), con el kit Certamp Complex (Biotools). La amplificación de podoplanina, CD44 y β -actina se realizó mediante PCR (35 ciclos: 1min a 95°C, 1 min a 59°C 1 min y 1,5 min a 72°C) utilizando NZYtaq 2x Green Master Mix (Nzytech). La amplificación de los cDNAs mutantes de podoplanina se realizó utilizando la enzima Phusion High-fidelity DNA polymerase mediante PCR (35 ciclos: 10s a 98°C, 30s a 59°C y 30s a 72°C).

Tabla 8. Secuencias de los cebadores utilizados para RT-PCR en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia
hs3	5' TTTGCTCCACCTTCTTGACTCC 3'
hs5	5' GATGGAGAAAGCTCTGAGCATC 3'
C13	5' AAGACATCTACCCAGCAAC 3'
V2	5' GATGAGCACTAGTGCTACAG 3'
V3a	5' ACGTCTTCAAATACCATCTC 3'
V3b	5' TGGGAGCCAAATGAAGAAAA 3'
V4	5' TCAACCACACCACGGGCTTT 3'
V5	5' GTAGACAGAAATGGCACCAC 3'
V6	5' CAGGCAACTCCTAGTAGTAC 3'
V7	5' CAGCCTCAGCTCATACCAGC 3'
V8	5' TCCAGTCATAGTATAACGCT 3'
V9	5' CAGAGCTTCTCTACATCACA 3'
V10	5' GGTGGAAGAAGAGACCCAAA 3'
C9	5' ACCTGAAGGTACCCAACTTCTCGACTGTTGAC 3'
ms5	5' CAACCGTGATGGTACTCGCT 3'
ms3	5' ATGAGTCACAGTGC GGGAAC 3'
PDPN humana directo	5' CGGGAACGATGTGGAAGGTGTCA 3'
PDPN humana reverso	5' GGGACAGGGCACAGAGTCAGAAAC 3'
PDPN ratón directo	5' AAAAACCCTAGCTGCTGAGGCTCCAA 3'
PDPN ratón reverso	5' ATGGGTCATCTTCTCCACAGGAAGAGG 3'
β -actina directo	5' GTGGGCCGCTCTAGGCACCA 3'
β -actina reverso	5' CTCTTTGATGTCACGCAGGATTC 3'
GAPDH directo	5' TGAAGGTCGGTGTGAACGGATTGTC 3'
GAPDH reverso	5' CATGTAGGCCATGAGGTCCACCAC 3'

5. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS

5.1 Inmunotransferencia (Western blot)

Los extractos totales se prepararon lisando las células con tampón RIPA (SDS 0.1%, Deoxicolato Sódico 0.5%, NP-40 1%, NaCl 150 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8.0) suplementado con un cocktail de inhibidores de proteasas (Calbiochem) e inhibidores de fosfatasa (NaF 500mM). Los extractos de tejido se prepararon de la misma manera, pero con un paso previo de disgregación y homogeneización del tejido empleando un politrón. Los extractos totales (20-30 μ g), cuantificados por el método BCA en el caso de líneas celulares o por el método Bradford en el caso de los tejidos, se fraccionaron en geles SDS-acrilamida al 10% en condiciones

desnaturalizantes, se transfirieron a membranas Inmobilon-P de PVDF (Millipore) y se incubaron durante 1h a temperatura ambiente con solución de bloqueo (leche 5% en TBS-Tween-20 0,1%). Posteriormente, las membranas se incubaron a 4°C durante toda la noche con los anticuerpos primarios especificados en la [Tabla 3](#) disueltos en solución de bloqueo. Después de 3 lavados de 5 min con TBS-Tween-20 0,1%, las membranas se incubaron con los correspondientes anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa ([Tabla 4](#)), durante 1h a temperatura ambiente. Las membranas se revelaron utilizando el sistema ECL (Pierce). En los Western blot de tejidos, los tiempos de lavado fueron de 10 min. Los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de, al menos, tres experimentos realizados.

5.2 Ensayo de co-inmunoprecipitación de proteínas

Para los ensayos de co-inmunoprecipitación, células HEK293T crecidas en placas de 60 mm y transfectadas con las construcciones de CD44-Ha o de podoplanina-Flag indicadas en las [Tablas 1 y 2](#), como se detalla en el [apartado 3.2](#) de esta sección, se lisaron 24h después de la transfección con el tampón de inmunoprecipitación (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, NaCl 100 mM, EDTA 5 mM, Glicerol 10%, NP-40 0.5%) suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas como se indica en el [apartado 6.1](#) de esta sección. Posteriormente, 750 µg de los lisados celulares se incubaron con el anticuerpo correspondiente ([Tabla 3](#)) y con 40µl de Dynabeads® proteína G (Life Technologies) durante toda la noche a 4°C. Tras realizar 4 lavados con el tampón de inmunoprecipitación, la fracción inmunoprecipitada se resuspendió en tampón Laemmli y las proteínas de interés se detectaron mediante Western blot con los anticuerpos correspondientes ([Tablas 3 y 4](#)). Se utilizaron 30 µg del extracto total como control de la transfección.

6. TRATAMIENTO IN VIVO CON TPA

Un grupo de ratones C57BL/6 machos, 7-9 semanas de edad, con el dorso afeitado el día anterior, se trataron con una única aplicación tópica de TPA (25 µg/ml) disuelto en acetona. Se utilizó como control un grupo de ratones tratados tópicamente con vehículo (acetona). A los tiempos indicados, se sacrificaron los ratones y se extrajo la piel completa (epidermis + dermis) de la zona tratada. Una parte del tejido se fijó con formaldehído 3,7% en PBS durante 24 h, y se mantuvo en etanol al 70% hasta su inclusión en parafina, para su análisis histológico por tinción de hematoxilina eosina (H&E), mientras que la otra parte se procesó para su análisis por Western blot, según se indica en el [apartado 6.1](#).

7. ANÁLISIS DE INMUNOFLUORESCENCIA Y MICROSCOPIA CONFOCAL

Todas las preparaciones se examinaron mediante microscopía confocal con el microscopio espectral LSM710 (Zeiss), utilizando los objetivos Plan-APOCHROMA 40X y 63X. Las preparaciones derivadas de los ensayos de degradación de gelatina se examinaron con el microscopio de fluorescencia Nikon 90i, utilizando el objetivo Plan-APO 40X. Todas las imágenes se procesaron utilizando el programa FIJI y las cuantificaciones de la co-localización de las distintas proteínas se realizaron utilizando el “plugging” JAcOP de ese mismo programa.

Tabla 9. Descripción de los mutantes de podoplanina empleados en esta tesis.

Mutante	Descripción
PDPNwt	Podoplanina “wild type”.
PDPN-ΔEC	Mutante de podoplanina con el dominio extracelular completamente deletado y sustituido por GFP.
PDPN-ΔECQN.N	Mutante de podoplanina con el dominio extracelular deletado y sustituido por GFP, y los aminoácidos responsables de su interacción con las proteínas ERM (RK.R) sustituidos por QN.N.
PDPN-S/Tm	Mutante de podoplanina con serinas potencialmente glicosiladas mutados al azar.
PDPN-PLAG3m	Mutante de podoplanina con el motivo PLAG3 (EDDVVTP) encargado de mediar su interacción con CLEC-2 mutado (EDDVVAP).
PDPN-ΔPLAG3	Mutante de podoplanina con el motivo PLAG3 deletado.
PDPN-TMCD45	Mutante de podoplanina con el dominio transmembrana sustituido por el de la proteína CD45.
PDPN-TMSYN	Mutante de podoplanina con el dominio transmembrana sustituido por el de la proteína sinaptobrevina.
PDPN-TMGPA	Mutante de podoplanina con el dominio transmembrana sustituido por el de la proteína glicoforina A.
PDPN-TMERBB2	Mutante de podoplanina con el dominio transmembrana sustituido por el del receptor ErbB2.
PDPN-G137L	Mutante de podoplanina con el motivo GXXXL responsable de su oligomerización y su localización en “lipid-rafts” mutado. Sustitución de G en posición 137 por L.
PDPN-ΔCT	Mutante de podoplanina con el dominio citoplasmático deletado.
PDPN-QN.N	Mutante de podoplanina con los aminoácidos básicos responsables de su interacción con las proteínas ERM (RK.R) mutados (QN.N).
PDPN-PLAG3S/TM	Mutante de podoplanina con el sitio de glicosilación T52 del motivo PLAG-3 mutado a A52.
PDPN-PLAG4S/TM	Mutante de podoplanina con el sitio de glicosilación T85 del motivo PLAG-4 mutado a A85.
PDPN-PLAG3/4STm	Mutante de podoplanina con los sitios de glicosilación T52,T85 del motivo PLAG-3 mutados a A52 y A85.
PDPN-I1S/TM	Mutante de podoplanina con las treoninas T65,T66,T70,S71,S74,T76 de la región denominada isla 1 mutadas a A.
PDPN-I2S/TM	Mutante de podoplanina con las serinas S98,T100,S107,S109,T110 de la región denominada isla 2 mutadas a A.
PDPN-I/2STm	Mutante de podoplanina con los residuos de S y T de las islas 1 y 2 mutados a A.

7.1 Inmunofluorescencia en cultivos celulares

Se sembraron células sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro. Las células se fijaron con formaldehído al 3,7% en medio de cultivo completo durante 20 min y se permeabilizaron con Triton X-100 0,05% en PBS durante 10 min. Tras lavar 4 veces con PBS, las células se tiñeron con faloidina Alexa 647 (1:500) durante 1h a 37°C. Para teñir los núcleos, las preparaciones se incubaron con DAPI (1:1000; Molecular Probes) durante 10 min a 37°C. Finalmente, las preparaciones se montaron en Prolong (Molecular Probes) y se analizaron mediante microscopía confocal.

Para los ensayos de co-localización de proteínas en los invadopodios efectuados en células sembradas sobre gelatina, las células se fijaron con formaldehído al 3,7% en medio de cultivo completo y se incubaron con el anticuerpo primario indicado en cada caso durante 1h a 37°C y con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado con Alexa 488 durante 1h. Posteriormente, las células se tiñeron con DAPI (1:1000) durante 10 min a 37°C y con faloidina-Alexa 647 (1:500; Invitrogen) durante 1h a 37°C. Las preparaciones se montaron en Prolong y se analizaron mediante microscopía confocal. Adicionalmente, el análisis de la localización de podoplanina y/o de las diferentes isoformas de CD44 en los invadopodios, se llevó a cabo sobre la célula viva co-expresando Lifeact-Rubby y la construcción indicada de podoplanina y/o CD44 fusionada a GFP.

7.2 Ensayos de degradación de gelatina

Los ensayos de degradación de gelatina se realizaron como se ha descrito previamente ([Martín-Villar et al., 2015](#)). Brevemente, se sembraron células sobre cubreobjetos de 12 mm de diámetro recubiertos con gelatina-TRITC fluorescente preparada en el laboratorio. Tras 6 h de incubación a 37°C, las células se fijaron con formaldehído al 3,7% en medio completo y se tiñeron con DAPI (1:1000) y faloidina-Alexa 488 (1:500) durante 1h a 37°C. Finalmente, las preparaciones se montaron con Prolong y se examinaron al microscopio de fluorescencia. Las imágenes se procesaron utilizando el software FIJI ([Figura 6](#)). Los invadopodios activos se identificaron como puntos de F-actina de la superficie basal de la célula que colocalizan con “agujeros” oscuros (semejantes a puntos) de matriz degradada en la brillante matriz fluorescente. Se consideró como degradación anómala, a las zonas oscuras de degradación de la gelatina no asociadas a los invadopodios. Parámetros como el número de invadopodios activos por célula, el número de células con invadopodios activos y áreas de degradación focal asociada a invadopodios o degradación anómala de la gelatina se determinaron manualmente utilizando el software FIJI.

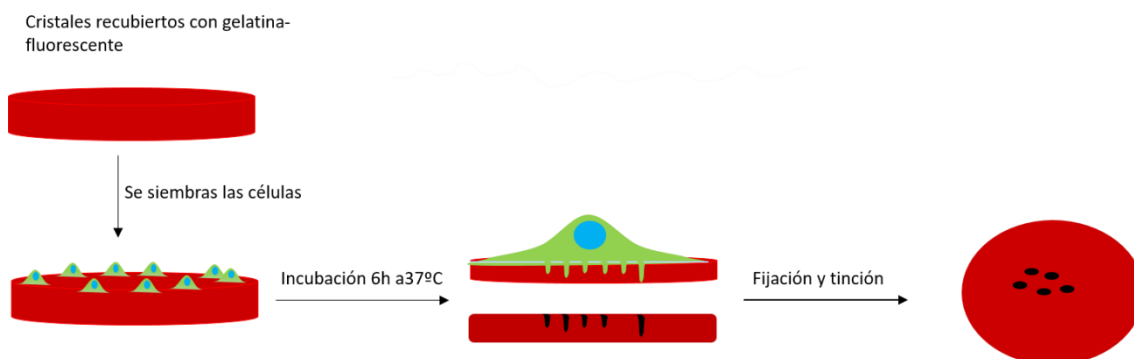


Figura 6. Ensayo de degradación de gelatina fluorescente. Cubreobjetos de vidrio se recubren con gelatina fluorescente (acoplada a rodamina). Las células se siembran sobre la gelatina y se incuban a 37°C durante 6h. Las áreas donde las células extienden los invadopodios a través de la matriz, los cuales provocan la degradación de la gelatina, aparecen como manchas oscuras cuando se observan desde arriba. [Adaptado de García, 2014.](#)

7.3 Análisis de invadopodios en células vivas

Se sembraron células HN5-Lifeact-Ruby ([Tabla 6](#)), interferidas previamente para la expresión de CD44 y/o podoplanina según el [apartado 3.4](#), en placas IBIDI de 6 pocillos recubiertas de gelatina. Las células se incubaron a 37°C y 5% CO₂, y tras 3h, se examinó la dinámica de aparición y desaparición de invadopodios en un microscopio “Cell Observer.Z1” (Zeiss), tomando imágenes cada 30s o 1min, dependiendo del experimento, durante 3 h. Las imágenes se analizaron utilizando el programa FIJI y la duración de los invadopodios se cuantificó durante 25 min.

7.4 Ensayos de invasión ex vivo sobre en membrana de mesenterio de ratón

Los experimentos de invasión a través de una membrana basal nativa se realizaron basándonos en el procedimiento publicado por Schoumacher y colaboradores ([Schoumacher et al., 2013](#)) con algunas variaciones. Un esquema del procedimiento se representa en la [Figura 7A](#). Brevemente, tras abrir la caja torácica del animal, se extrajo el intestino sin cortar y tras extenderlo con un par de pinzas se colocó recubriendo el fondo de insertos de cámaras Transwell (Falcon) a los que previamente se había cortado el filtro de policarbonato con un escalpelo. Para fijar las membranas basales del mesotelio al soporte Transwell se utilizó una mezcla de vaselina/parafina (1:1) caliente que al enfriarse solidificó. Tras lavar con PBS, se trató con NH₄OH 0,5 N durante 30 min para eliminar las células y los restos de sangre y otros residuos, y, a continuación, se realizó un nuevo lavado con ETOH 70% durante 15 min. Las membranas se guardaron en PBS suplementado con Fungizona, penicilina (100 U/ml) y estreptomicina (100 µg/ml) a 4°C hasta su uso.

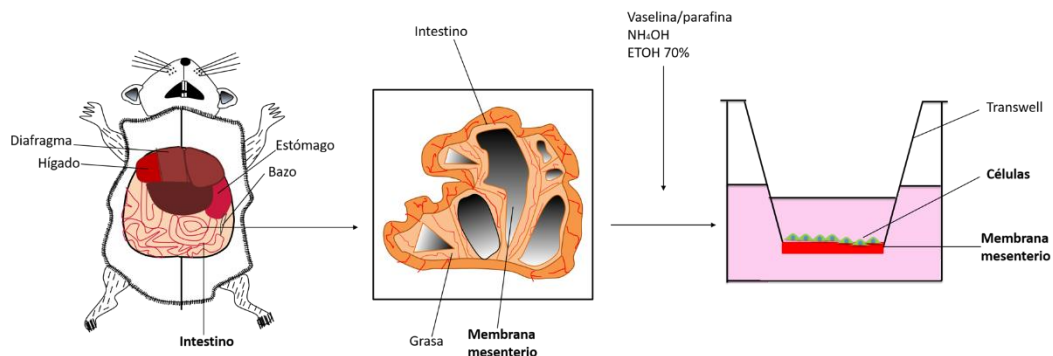
Para los ensayos de invasión, las células se sembraron sobre las membranas de mesenterio y se incubaron durante 6 h o 4 días a 37°C y 5% CO₂. A continuación, las células se fijaron con formaldehído al 3,7% y se lavaron 4 veces con PBS. Para analizar la degradación de la membrana basal, las membranas se tiñeron con un anticuerpo anti-laminina V (Tabla 3) durante 1h a 37°C y, a continuación, con un anticuerpo secundario conjugado con Alexa 546 durante 1h a 37°C. Tras incubar con el anticuerpo secundario, las células se permeabilizaron con Triton X-100 0,05%. La permeabilización no se realizó al principio para evitar que el anticuerpo anti-laminina V entrara dentro de las células. Los núcleos se tiñeron con DAPI (1:1000) y el citoesqueleto de las células con faloidina-Alexa 488 (1:500) durante 1h a 37°C. Finalmente, las membranas se montaron con Fluoromont (Sigma-Aldrich). Los soportes Transwell se examinaron mediante microscopía confocal sobre cubreobjetos cuadrangulares de 22 mm colocados en soportes especiales generados mediante una impresora 3D (Servicio de Microscopía del Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols, IIBM) con un objetivo Plan-APOCHROMAT de 40X. Las imágenes de fluorescencia se adquirieron cada 0,6 µm a lo largo del eje z y se representaron los perfiles de intensidad mediante el programa FIJI.

La degradación de la membrana basal se cuantificó midiendo la intensidad de fluorescencia media acumulada de todos los planos correspondientes a la señal de laminina V (roja). La invasión se determinó mediante la fluorescencia correspondiente al marcaje con faloidina, estableciendo en el perfil de intensidad una línea de corte coincidente con el final de la membrana basal (Figura 7B, panel izquierdo). Se consideraron células que habían invadido la membrana a aquellas situadas por debajo de este límite, con respecto a las células no invasoras o en proceso de invasión, situadas por encima del límite establecido.

8. TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Las figuras mostradas en esta tesis son representativas de tres a cinco experimentos independientes. Los datos fueron analizados usando el programa estadístico GraphPad Prism 5.0. La significancia de las diferencias se determinó mediante el test de ANOVA unidireccional seguido por el post-test de comparación múltiple de Bonferroni.

A



B

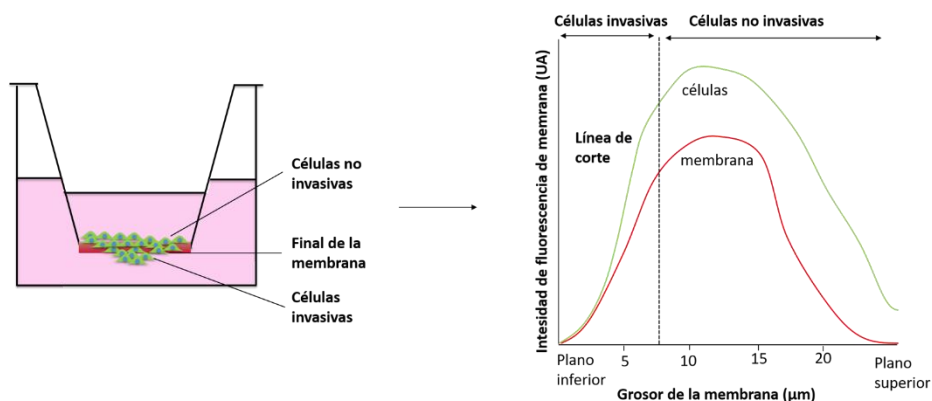


Figura 7: Esquema del ensayo de invasión *ex vivo* a través de una membrana basal de mesenterio de ratón. (A) Esquema representativo del procedimiento para obtener insertos Transwell con la membrana de mesenterio incorporada. Para detalles adicionales véase el texto. **(B)** Esquema del ensayo de invasión (panel izquierdo). La integridad de la membrana se midió por la intensidad media de fluorescencia de laminina V (roja) acumulada a lo largo de todos los planos adquiridos a lo largo del eje z. La proporción de células invasivas y no invasivas se determinó mediante la intensidad de fluorescencia correspondiente a faloidina (verde) por encima (no invasivas o en proceso de invasión) y por debajo (invasivas) de una línea de corte determinada por el final de la membrana basal, como se indica en el panel derecho.

RESULTADOS

1. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN CONJUNTA DE PODOPLANINA Y CD44 IN VIVO E IN VITRO

1.1 TPA induce la expresión de podoplanina y CD44 de forma coordinada en la piel de ratón

Nuestro laboratorio ha descrito anteriormente que podoplanina se expresa de manera coordinada con la isoforma estándar de CD44 (CD44s) durante la progresión maligna de carcinomas y la transición epitelio-mesénquima ([Martín-Villar et al., 2010](#)). Dicha correlación podría no ser exclusiva de CD44s, ya que ciertas isoformas CD44v parecían también co-expresarse con podoplanina durante la carcinogénesis *in vivo*. Por otro lado, hace algunos años, nuestro grupo describió que la expresión de podoplanina se induce en la piel de ratón durante procesos de remodelación tisular y en respuesta a estímulos pro-inflamatorios, como el éster de forbol TPA ([Gandarillas et al., 1997](#)). Para investigar si realmente existe una correlación entre la expresión de podoplanina y la de CD44v y CD44s en un contexto fisiológico, analizamos cómo varía la expresión de estas proteínas en la piel de ratón tras aplicar TPA de manera tópica, un estímulo que produce una hiperplasia en la epidermis y la aparición de tejido de granulación ([Mueller, 2006](#)). Como se observa en la [Figura 8A](#), estos efectos se observan entre las 24-72 h tras la aplicación de TPA, mientras que a las 144h la piel recupera su estado normal. La expresión de podoplanina y CD44 se analizó mediante Western blot, en extractos de piel de los ratones tratados, utilizando anticuerpos específicos que reconocen podoplanina (mAb PA2.26) y todas las isoformas de CD44 (mAb HP2/9). En la [Figura 8B](#) se observa cómo la inducción de la expresión de podoplanina ocurre de manera coordinada, no sólo con CD44s, sino también con las isoformas CD44v que se expresan en la piel. Este aumento de expresión se mantiene entre las 12-96 h, siendo su máximo entre las 12-48h, coincidiendo con la hiperplasia de la epidermis y la aparición del tejido de granulación. Conviene señalar que, en la piel sin tratar (0 h), la expresión tanto de CD44v como de CD44s es significativamente mayor que la de podoplanina. No obstante, TPA induce un aumento en la expresión de todas ellas de forma coordinada. Estos resultados sugieren que podoplanina podría asociarse *in vivo*, no sólo con CD44s, sino con isoformas CD44v.

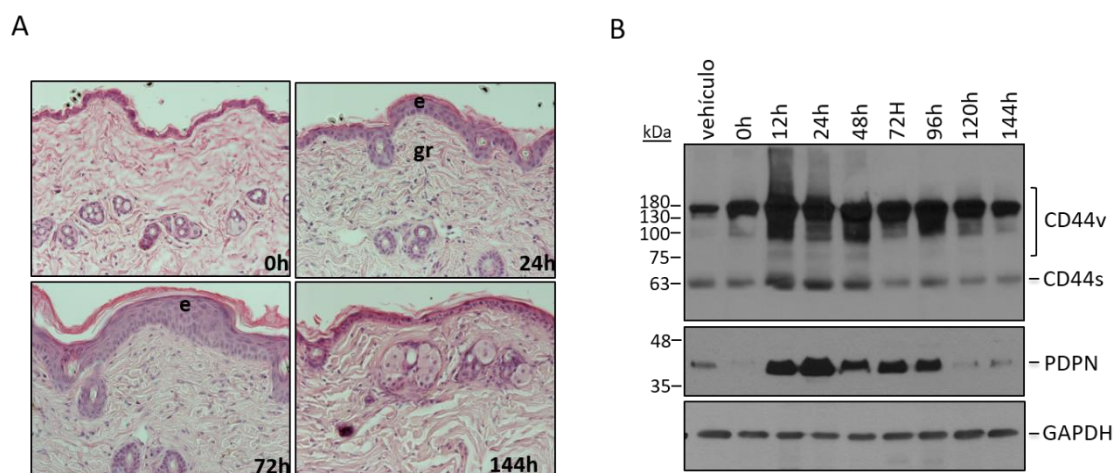


Figura 8. La expresión de podoplanina y CD44 se induce de manera coordinada en la piel tras la aplicación tópica de TPA. (A) Tinción de H&E de secciones de piel de ratón tras la aplicación de una única dosis de TPA (25 µg/ml). Las muestras fueron procesadas a los tiempos que se indican tras el tratamiento. El éster del forbol TPA induce una hiperplasia en la piel (24-72h) caracterizada por el engrosamiento de la epidermis (e) y la aparición de tejido de granulación (gr). (B) Análisis de la expresión de podoplanina y CD44 mediante Western blot en extractos de piel obtenidos a los tiempos indicados tras el estímulo. En el blot se muestra el tratamiento con vehículo (acetona) a las 24h, como control. Nótese una ligera inducción de la expresión de podoplanina tras el tratamiento con acetona, probablemente debida a un shock térmico ('cold shock'). GAPDH se utilizó como control de carga.

1.2 Expresión de podoplanina y CD44 en líneas celulares del modelo de carcinogénesis química en piel de ratón

A continuación, analizamos la expresión de dichas proteínas en líneas celulares representativas de distintos estadios de progresión del modelo de carcinogénesis química en piel de ratón (Tabla 5) con el fin de identificar cuáles son las isoformas de CD44 que se expresan en este modelo y determinar si existe alguna relación entre su expresión y la de podoplanina. Para ello, en primer lugar, analizamos la expresión de podoplanina y CD44 mediante RT-PCR. El análisis de las diferentes isoformas de CD44 se llevó a cabo mediante el diseño de una pareja de oligos (ms5 y ms3) complementarios a los exones constantes que flanquean los exones variables de la secuencia del cDNA murino de CD44 (Tabla 9; Figura 9A). Como se observa en la Figura 9B, la abundancia de CD44s (300 pb) y CD44v (500-900 pb) varía dependiendo de la línea celular. En general, la expresión de CD44s es muy abundante en todas las líneas, aunque parece aumentar durante la progresión a carcinomas indiferenciados o SpCC (A5, CarB, CarC). Por el contrario, la expresión de CD44v disminuye gradualmente durante la progresión de papiloma (PB) a SCC bien/moderadamente diferenciado (PDV, B9), para finalmente desaparecer en las líneas SpCC (Figura 9B). Sin embargo, observamos la aparición de una isoforma CD44v (400 pb) específicamente en las líneas SpCC (Figura 9B, asterisco). Con el fin de identificar las isoformas CD44v que se expresan en este modelo, intentamos aislar y secuenciar las diferentes bandas;

no obstante, debido a la abundancia y al tamaño similar de las distintas bandas, tan sólo conseguimos aislar satisfactoriamente la isoforma específica de las líneas SpCC (400 pb). Dicha isoforma contiene, además de los exones constantes, únicamente el exón variable v10 y, por lo tanto, se denomina CD44v10. Respecto al resto de las isoformas expresadas en dichas líneas, los análisis basados en el tamaño de las bandas y los exones variables de CD44, sugieren que podrían tratarse de CD44v2-10/v3-10, CD44v6-10/v7-10 y CD44v8-10. En cuanto a podoplanina, observamos que su mRNA se co-expresa con las distintas isoformas de CD44 en todas las líneas analizadas, excepto en MCA3D (queratinocitos inmortalizados), de la que está ausente.

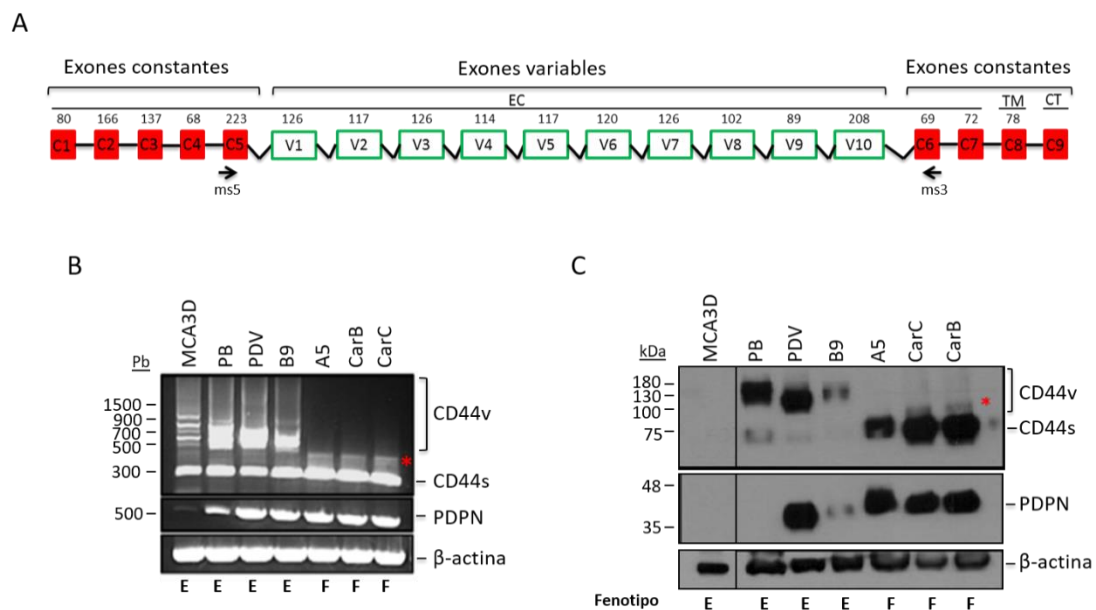


Figura 9. Expresión de podoplanina y CD44 en líneas celulares derivadas del modelo de carcinogénesis química en piel de ratón. (A) Representación esquemática del gen CD44 murino y de los oligos utilizados para el análisis de RT-PCR. Los números encima de los exones constantes (C) y variables (V) indican el tamaño en pares de bases. EC: extracelular; TM: transmembrana; CT: citoplasmático. **(B)** Análisis de la expresión de CD44 y podoplanina por RT-PCR. El asterisco indica una banda que fue identificada como CD44v10. **(C)** Análisis de la expresión de CD44 y podoplanina mediante Western blot. El asterisco indica la presencia de una banda con un tamaño ligeramente superior al de CD44s que podría corresponder a CD44v10. β-actina se utilizó como control de carga de RNA y proteína. E: Epitelial; F: fibroblástico.

El análisis de expresión de podoplanina y CD44 mediante Western blot en estas mismas líneas celulares mostró resultados muy semejantes (Figura 9C), indicando que existen pocas discrepancias en cuanto a los niveles de expresión de mRNA y proteína. Una excepción es el caso de los queratinocitos inmortalizados MCA3D, en los que la expresión de CD44 a nivel de proteína es apenas detectable, a diferencia de lo observado a nivel de mRNA (Figura 9B-C). El resultado del Western blot mostró de forma aún más patente el aumento de la expresión de CD44s (80kDa) y la disminución de los niveles de CD44v (100-180 kDa) durante la progresión a SpCC.

RESULTADOS

Las isoformas CD44v finalmente desaparecen en las líneas SpCC, salvo la CD44v10 que podría corresponder a la banda débil de 85 kDa señalada en la Figura X2C. Por otro lado, podoplanina se expresa en la mayoría de las líneas celulares a niveles variables, aunque está ausente de queratinocitos premalignos (MCA3D y PB). Estos resultados concuerdan con resultados previos del laboratorio ([Martín-Villar et al., 2010](#)) y sugieren que podoplanina, CD44s y CD44v podrían cooperar para favorecer la progresión maligna de SCCs.

1.3 Podoplanina se expresa conjuntamente con CD44s y varias isoformas CD44v en líneas celulares humanas de SCCs

Para comprobar si el patrón de expresión de isoformas de CD44 en líneas celulares murinas de SCC es equivalente al de los modelos humanos, analizamos, en primer lugar, la expresión de CD44 y podoplanina mediante RT-PCR en un panel de líneas celulares humanas de SCC de diferentes orígenes ([Tabla 6](#)). Para el análisis de CD44 seguimos una estrategia similar a la planteada en el apartado anterior, diseñando una pareja de oligos (denominados hs5 y hs3) que nos permitiera amplificar simultáneamente todas las isoformas de CD44 mediante RT-PCR ([Figura 10A; Tabla 8](#)). Como se muestra en la [Figura 10B](#), todas las líneas celulares expresan el transcrito de CD44s (400pb), así como los transcritos correspondientes a diferentes isoformas CD44v (800-1500 pb), que también se co-expresan con el mRNA de podoplanina (500 pb), salvo en el caso de los queratinocitos inmortalizados HaCaT. El patrón de expresión de CD44v en estas células resultó ser más heterogéneo que el de los modelos celulares murinos ([Figura 9A](#)), ya que el número de transcritos correspondientes a CD44v era mayor y sus patrones de expresión diferían entre las diversas líneas. Por esa razón, decidimos centrarnos en tres líneas celulares representativas: HN5, A253 y HaCaT (queratinocitos humanos inmortalizados no tumorigénicos) ([Figura 10C](#)). Estas líneas celulares expresan de manera más abundante, aunque con diferencia entre ellas, tres transcritos de 1500, 1013 y 800 pb, que denominamos, respectivamente, isoformas 1,2 y 3. Teniendo en cuenta que el transcrito de 400 pb corresponde a CD44s y basándonos en la información presente en las bases de datos, realizamos una estimación de los exones variables que podría contener cada uno estos transcritos. Así, estimamos que la isoforma 1 (1500 pb) podría contener todos los exones variables (CD44v2-10), la isoforma 2 (1013 pb) los exones v2-6 o v6-10, y la isoforma 3 (800 pb) los exones v2-5 o v8-10.

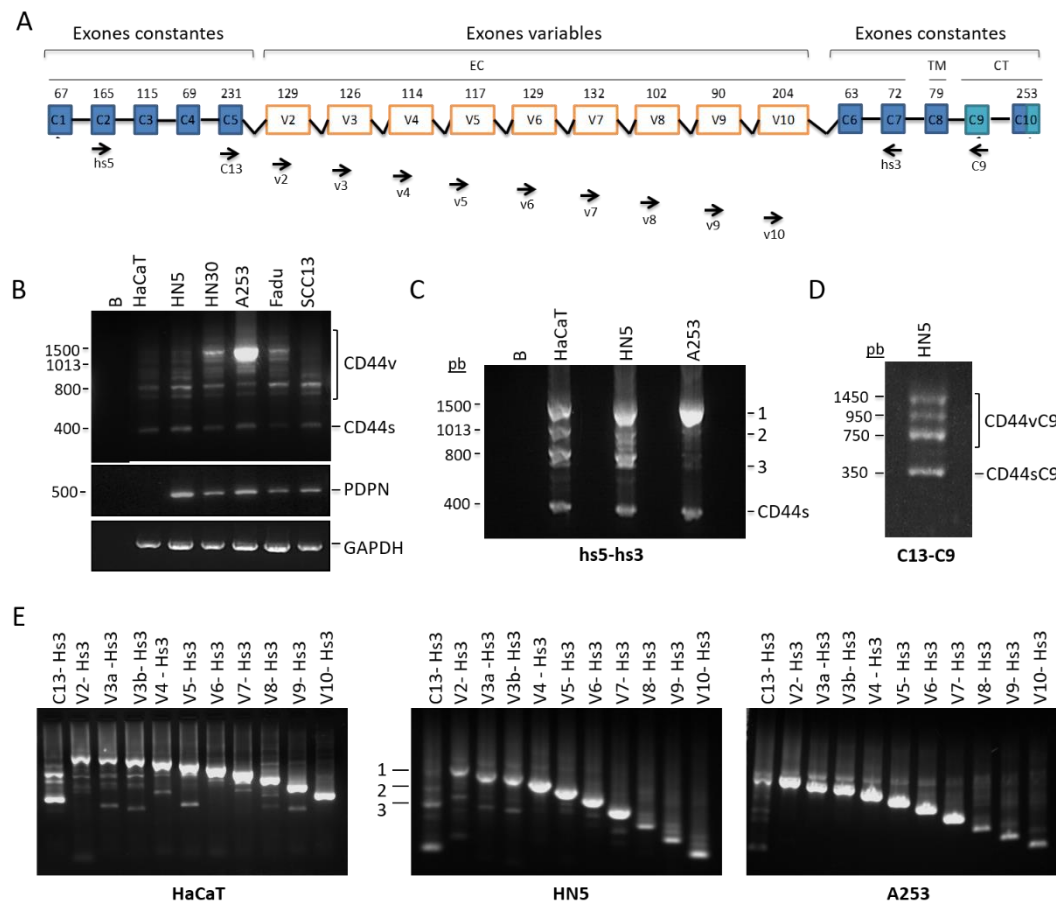


Figura 10. Expresión de CD44 y podoplanina en líneas celulares humanas de SCC a nivel de mRNA. (A) Representación esquemática del gen CD44 humano, indicándose los oligos utilizados para los diferentes análisis. Los números encima de los exones constantes (C) y variables (V) indican su tamaño en pares de bases. (B) Análisis de la expresión de podoplanina y CD44 mediante RT-PCR. Para CD44 se utilizó la pareja de oligos hs3-hs5. GAPDH se utilizó como control de carga. (C) Análisis de la expresión de CD44 mediante RT-PCR en las líneas celulares indicadas, utilizando la pareja de oligos hs5-hs3. Se detectan predominantemente tres isoformas CD44v que denominamos 1,2 y 3. (D) Análisis de la expresión de las isoformas cortas de CD44 (CD44sC9 y CD44vC9) en células HN5, utilizando la pareja de oligos C13-C9, indicados en el panel A. (E) Caracterización de los exones variables de CD44 presentes en las líneas HaCaT, HN5 y A253 por RT-PCR, utilizando oligos específicos para cada uno de los exones, según se indica en cada caso.

Para definir más precisamente los exones variables que contiene cada isoforma, realizamos diferentes aproximaciones. En primer lugar, empleamos oligos específicos de cada uno de los exones variables (Tabla 8; Figura 10A), y comparamos el perfil de expresión obtenido con cada una de las diferentes parejas de oligos (Konig et al., 1996). Como se muestra en la figura 10E, en las 3 líneas celulares obtuvimos un patrón característico en escalera que confirma la presencia de una isoforma que contiene todos los exones variables (1500pb; CD44v2-10), la cual ha sido descrita como una isoforma característica de queratinocitos (Rajajaran et al., 2012). Además, estos resultados apuntaban también a que las células, fundamentalmente HaCaT y HN5, expresaban isoformas que contienen los exones v6-10 y v8-10, que podrían corresponder a las

RESULTADOS

isoformas 2 y 3, respectivamente (Figura 10E). Finalmente, el aislamiento y secuenciación de cada una de estas isoformas, reveló que, la isoforma 1 correspondía, no a la isoforma CD44v2-10, sino a CD44v3-10, la isoforma 2 a CD44v6-10, y la isoforma 3 a CD44 v8-10. Además, empleando la pareja de oligos C13-C9 (Figura 10A), identificamos también en la línea celular HN5 la presencia de diversas “isoformas cortas” de CD44 que presentan un dominio citoplasmático truncado (Screaton et al., 1992), a las que denominamos CD44vC9 y CD44sC9 (Figura 10D).

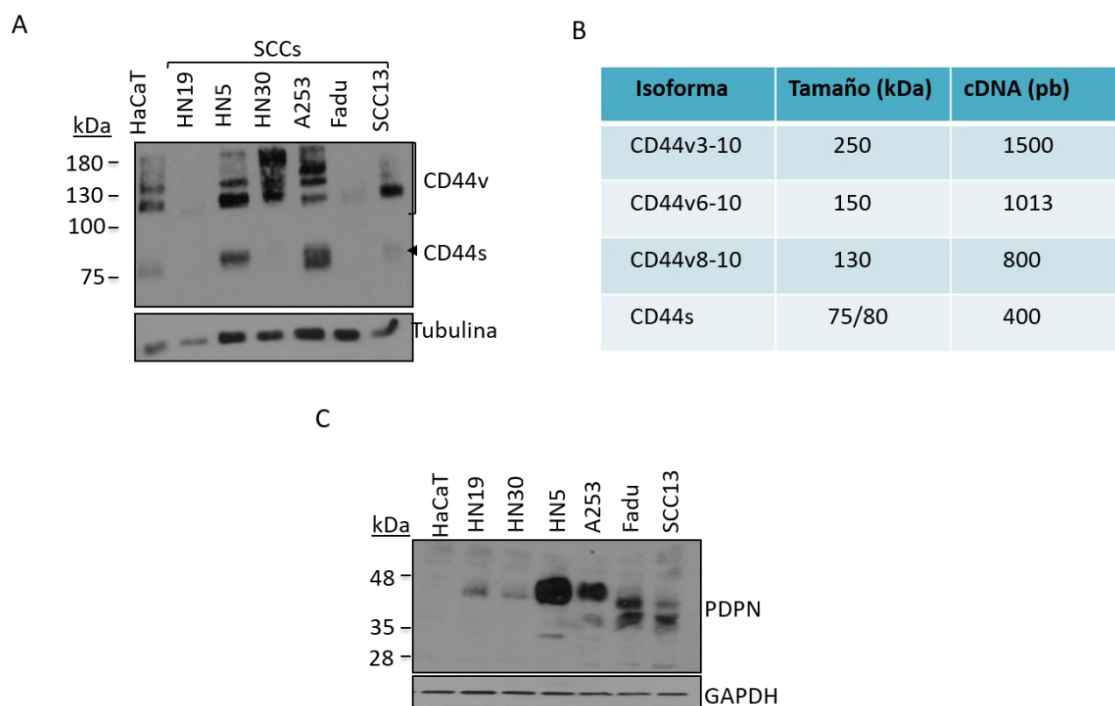


Figura 11. Expresión de podoplanina y CD44 en líneas celulares humanas de SCC. (A) Expresión de CD44 en las líneas celulares indicadas mediante Western blot usando el anticuerpo HP2/9 que reconoce todas las isoformas de CD44. Los tamaños de las diferentes isoformas identificadas se presentan en la tabla del panel **B**. **(C)** Expresión de podoplanina usando el anticuerpo NZ-1. α -Tubulina y GAPDH se utilizaron como controles de carga.

Con el fin de determinar si los transcritos presentes en las distintas líneas celulares se traducen finalmente a proteína, analizamos la expresión de CD44 mediante Western blot, utilizando un anticuerpo (HP2/9) cuyo epítipo reside en una zona común a todas las isoformas (Figura 11A). Al menos cinco isoformas diferentes fueron detectadas en las líneas analizadas. La isoforma de menor tamaño (85 kDa) corresponde a CD44s, mientras que la de 250 kDa probablemente es la isoforma de queratinocitos CD44v3-10 (Rajarajan et al., 2012). Los tamaños estimados para las isoformas CD44v6-10 y CD44v8-10 descritas anteriormente como isoformas 2 y 3, respectivamente, podrían corresponder a las bandas de 150 y 130 kDa. En la Figura 11B se presenta un resumen con los tamaños de las principales isoformas detectadas. Además, se

observó la presencia de otra banda de 180 kDa que podría ser una forma de CD44s o CD44v con diferentes modificaciones de glicosilación, ya que su presencia no es constante en las diferentes líneas celulares. El análisis de la expresión de podoplanina reveló que esta proteína se expresa conjuntamente con las isoformas CD44v y que, además, existe una cierta correlación positiva entre los niveles de expresión de podoplanina y CD44s ([Figura 11C](#)), como se había descrito previamente ([Martín-Villar et al., 2010](#)).

En conjunto, estos resultados muestran que las principales isoformas CD44v presentes en las líneas celulares SCC humanas son: CD44v3-10, CD44v6-10 y CD44v8-10, las cuales se expresan conjuntamente con podoplanina. Por lo tanto, podoplanina podría interactuar en estas células, no sólo con CD44s, tal como habíamos descrito previamente ([Martín-Villar et al., 2010](#)), sino también con las isoformas CD44v descritas en este apartado.

2. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE PODOPLANINA CON CD44s Y CD44v Y CARACTERIZACIÓN DE LOS DOMINIOS IMPLICADOS

2.1 Aislamiento y caracterización de los cDNAs correspondientes a las diferentes isoformas de CD44

Una vez caracterizadas las isoformas de CD44v presentes en las líneas celulares humanas de SCC, aislamos los cDNAs correspondientes a CD44v3-10, CD44v6-10, CD44v8-10, así como CD44s con el dominio CT truncado (CD44sC9). Posteriormente, estos cDNAs se clonaron en los vectores de expresión pcDNA3-Ha y pEGFP-N1, que contienen el epítipo hemaglutinina (Ha) y la proteína verde fluorescente (eGFP), respectivamente. En la [Figura 12A](#), se muestra una representación esquemática de las diferentes construcciones.

Con el fin de comprobar si los cDNAs clonados correspondían realmente con las isoformas detectadas mediante Western blot en las líneas celulares ([Figura 11](#)), estas construcciones, junto con la de CD44s previamente generada en nuestro laboratorio, fueron transfectadas en células HEK293T. El tamaño molecular de las diferentes isoformas se evaluó mediante Western blot, empleando un anticuerpo que reconoce específicamente el epítipo Ha. Como se muestra en la [Figura 12B](#), los resultados obtenidos confirmaron los tamaños moleculares que habíamos predicho para cada una de las isoformas en el apartado anterior. Sin embargo, también se obtuvieron algunas bandas adicionales de menor tamaño molecular para cada una de las isoformas, que probablemente corresponden a formas menos glicosiladas.

A continuación, evaluamos si las diferentes isoformas aisladas de CD44v presentan una localización subcelular diferente a la de CD44s en células de SCC. Para estos estudios seleccionamos la línea celular HN5, en la que la localización de podoplanina y CD44 se había investigado previamente ([Martín-Villar et al., 2010](#)). Las diferentes construcciones de CD44v y CD44sC9 fusionadas a GFP fueron co-transfectadas junto a una construcción de CD44s fusionada a la proteína roja fluorescente mRFP ([Figura 12A](#)), y su localización subcelular se analizó mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Como se observa en la [Figura 12C](#), tanto CD44v como CD44sC9 se concentran en proyecciones de la membrana plasmática y contactos célula-célula, donde co-localizan con CD44s. La cuantificación de la co-localización utilizando el coeficiente de Pearson reveló un valor próximo a 1 para CD44v3-10 y CD44v8-10 y algo menor para CD44sC9 ([Figura 12D](#)), lo que sugiere un alto grado de co-localización para las isoformas analizadas. Aunque no se muestra CD44v6-10, la localización subcelular de esta isoforma es similar a la del resto de isoformas CD44v (véase más adelante). Puesto que CD44s co-localiza

con podoplanina en esta línea celular (Martín-Villar et al., 2010), estos resultados sugieren, además, una co-localización de podoplanina con las isoformas CD44v. Para confirmar esta hipótesis, co-transfectamos células HN5 con las isoformas de CD44 fusionadas a GFP y podoplanina fusionada a mCherry (Figura 13A) y analizamos su posible co-localización. Como se observa en la Figura 13, todas las isoformas CD44v y CD44sC9 co-localizan con podoplanina en las proyecciones de la superficie celular y contactos célula-célula, con coeficientes de Pearson significativamente elevados (0.90-0.95).

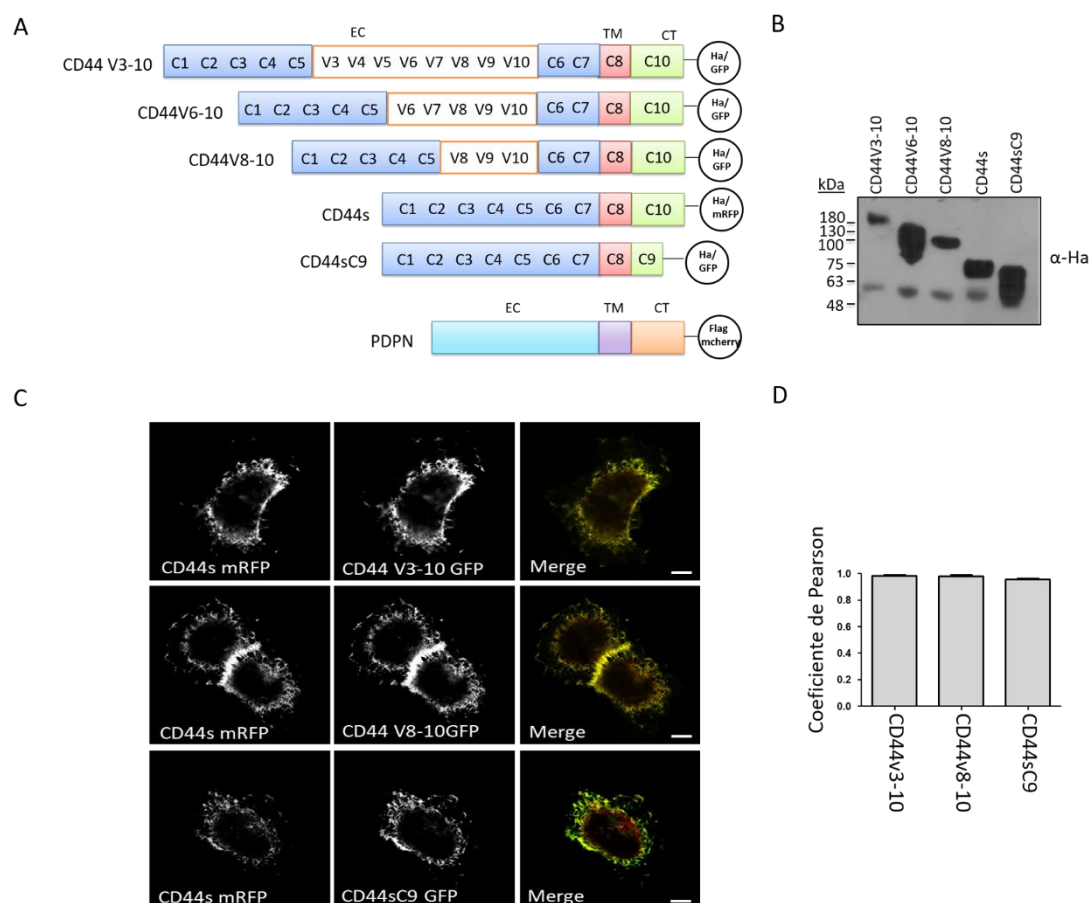


Figura 12. Caracterización de las isoformas CD44v identificadas en células SCC. (A) Representación esquemática de las construcciones CD44v utilizadas para analizar su potencial asociación con podoplanina. EC, dominio extracelular; TM, dominio transmembrana; CT, dominio citoplasmático. **(B)** Análisis de los tamaños de las isoformas CD44 indicadas, etiquetadas con Ha, tras su transfección en células HEK-293T, mediante Western blot utilizando un anticuerpo anti-Ha. **(C)** Análisis de la co-localización subcelular de CD44v3-10, CD44v8-10 y CD44sC9 con CD44s mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal en células HN5. Se utilizaron construcciones CD44v y CD44sC9 fusionadas a eGFP y CD44s fusionada a mRFP. Barra = 10 μ m. **(D)** Cuantificación de la co-localización utilizando el coeficiente de Pearson. Los datos de la gráfica son los valores medios \pm error estándar (n = 3).

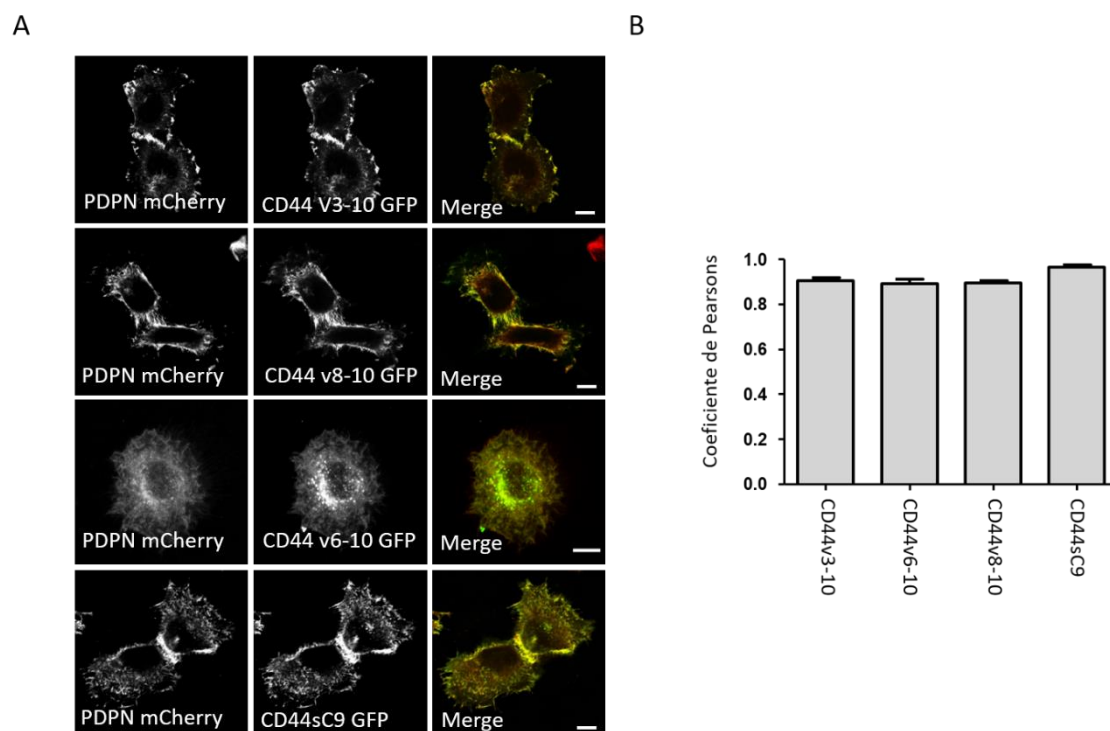


Figura 13. Análisis de la co-localización subcelular de CD44V3-10, CD44V6-10, CD44V8-10 y CD44sC9 con podoplanina. (A) Las distintas construcciones de CD44-GFP y PDPN-mCherry se co-transfectaron en células HN5, y la localización subcelular de las proteínas se analizó mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Barra = 10 μ m. **(B)** Cuantificación de la co-localización utilizando el coeficiente de Pearson. Los datos de la gráfica son los valores medios \pm error estándar (n = 10-12 para CD44v3-10, CD44v6-10 y CD44v8-10; n = 2 para CD44sC9).

En conjunto, los resultados de co-expresión de podoplanina y CD44v, junto con la co-localización subcelular de estas proteínas, sugieren una posible interacción de podoplanina con CD44v, al igual que ocurre con CD44s.

2.2 Podoplanina interacciona con las isoformas CD44v

Tras confirmar la co-localización de podoplanina con las diferentes isoformas CD44v en la superficie celular, analizamos si existe una interacción física real entre estas proteínas mediante ensayos de co-inmunoprecipitación. Para ello, co-transfectamos las construcciones CD44v3-10-Ha, CD44v6-10-Ha, CD44v8-10-Ha y CD44sC9-Ha con la de podoplanina fusionada al epítipo Flag (PDPN-Flag) en células HEK293T, según se indica en la [Figura 14A](#). Nuestros resultados muestran que las isoformas CD44v3-10, CD44v6-10 y CD44v8-10 co-precipitan con podoplanina arrastrada por un anticuerpo anti-Flag. Sin embargo, la isoforma CD44sC9 sólo pudo detectarse utilizando exposiciones más largas ([Figura 14B, panel derecho, L](#)). Estos resultados sugieren que podoplanina tiene el potencial de interaccionar con todas las isoformas CD44 presentes en células SCC, especialmente con CD44s, CD44v3-10, CD44v6-10 y CD44v8-10, y, en menor medida, con CD44sC9.

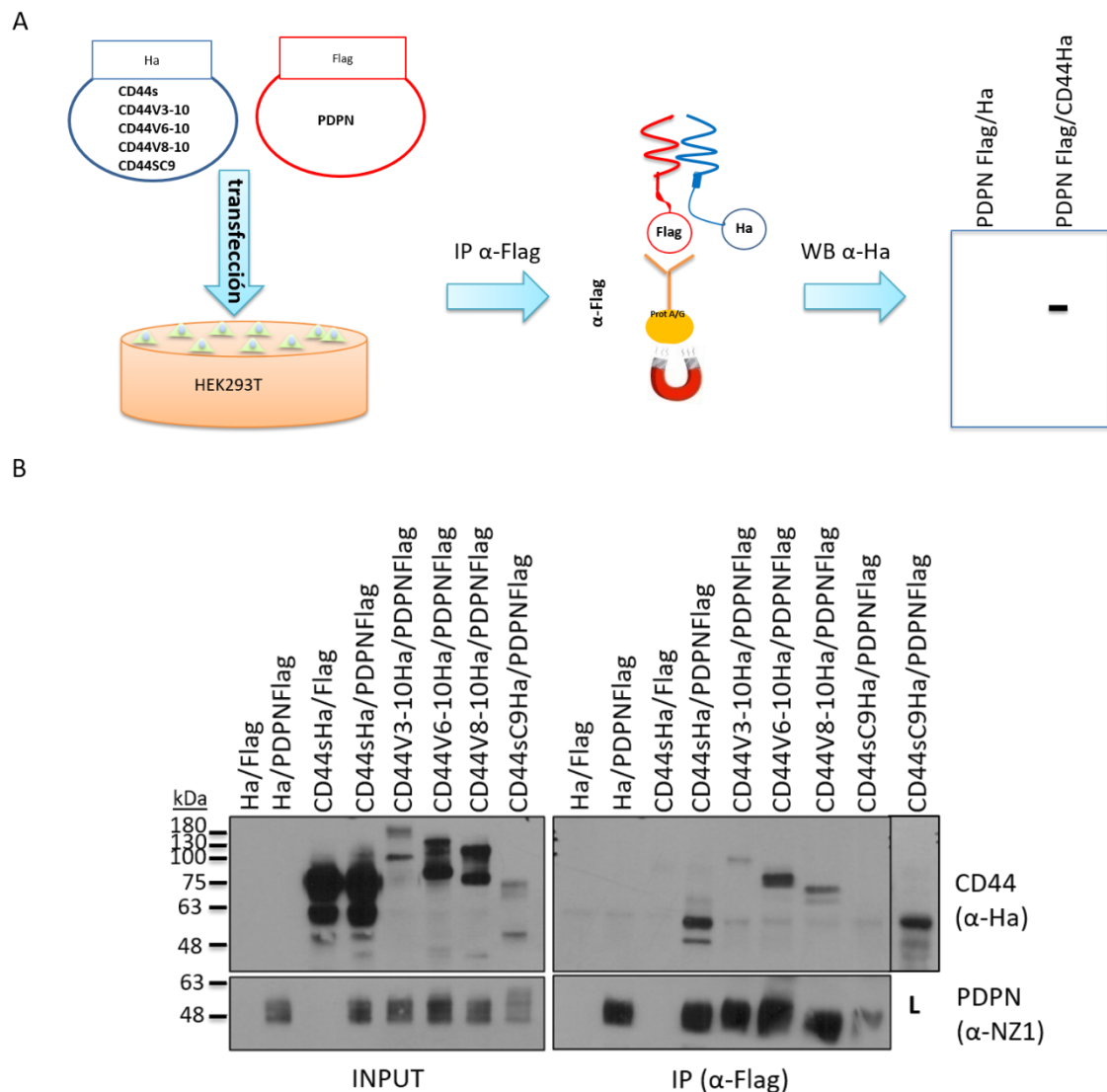


Figura 14. CD44v3-10, CD44v6-10, CD44v8-10 y CD44sC9 co-inmunoprecipitan con podoplanina. (A) Representación esquemática del ensayo de co-inmunoprecipitación. Como controles negativos se usaron los plásmidos pcDNA3Ha y pcDNA3Flag no modificados. La inmunoprecipitación se llevó a cabo usando un anticuerpo anti-Flag y bolas magnéticas que contenían proteína A/G. La presencia de isoformas de CD44 en los inmunoprecipitados se analizó mediante Western blot con un anticuerpo anti-Ha. **(B)** Co-inmunoprecipitación de podoplanina y CD44 en los extractos celulares de HEK293T. En el panel superior izquierdo se muestra la expresión de las diferentes construcciones en los lisados totales empleando un anticuerpo anti-Ha. En el panel superior derecho, se muestran los resultados de la co-inmunoprecipitación, donde se observa la presencia de bandas correspondientes a las distintas isoformas CD44s y CD44v; en el caso de CD44sC9, tras una exposición más larga (L). En los paneles inferiores, se muestra la expresión de podoplanina en el extracto total (panel izquierdo) o en el inmunoprecipitado (panel derecho) empleando un anticuerpo específico NZ-1.

2.3 Análisis de los dominios estructurales de podoplanina implicados en la interacción con CD44

Para profundizar en nuestro conocimiento sobre la interacción entre podoplanina y CD44, analizamos la implicación de los diferentes dominios estructurales de podoplanina en dicha interacción. Para ello, empleamos construcciones mutantes en las que se alteraron diferentes regiones de la proteína ([Figura 15A](#)). Así, utilizamos distintos mutantes del dominio extracelular: con la delección completa del dominio (PDPN- Δ EC); con mutaciones en S y T potencialmente responsables de la glicosilación de la proteína (PDPN-S/Tm); y con el dominio PLAG3 implicado en la interacción de podoplanina con la proteína plaquetaria CLEC-2 ([Kaneko et al., 2006](#)) deletado o mutado (PDPN- Δ PLAG3 y PDPN-PLAG3m, respectivamente). También se utilizaron construcciones mutantes del dominio transmembrana en las que se cambió esta región por la de la proteína CD45 (PDPN-TMCD45), o se mutó el motivo responsable de la oligomerización de podoplanina en la membrana y su incorporación a "lipid rafts" (PDPN-G137L) ([Fernández-Muñoz et al., 2011](#)). Además, se utilizaron construcciones mutantes del dominio citosólico, en las que se deletó dicha región (PDPN- Δ CT) o se mutaron los tres aminoácidos (RK...R; PDPN-QN.N) responsables de la unión de podoplanina con las proteínas de la familia ERM ([Martín-Villar et al., 2006](#)). Por último, se utilizó una construcción en la que no sólo se deletó el dominio extracelular, sino que, además, se mutaron los tres aminoácidos responsables de la unión a ERM (PDPN- Δ ECQN.N). Todas estas construcciones fusionadas al epítipo Flag, fueron co-transfectadas junto con CD44s-Ha en células HEK-293T y se llevaron a cabo ensayos de co-inmunoprecipitación empleando un anticuerpo anti-Ha. Elegimos CD44s para estos ensayos debido a que, junto con CD44v6-10, es la isoforma que mostró un mayor grado de co-inmunoprecipitación con podoplanina en el experimento anterior ([véase la Figura 14B](#)).

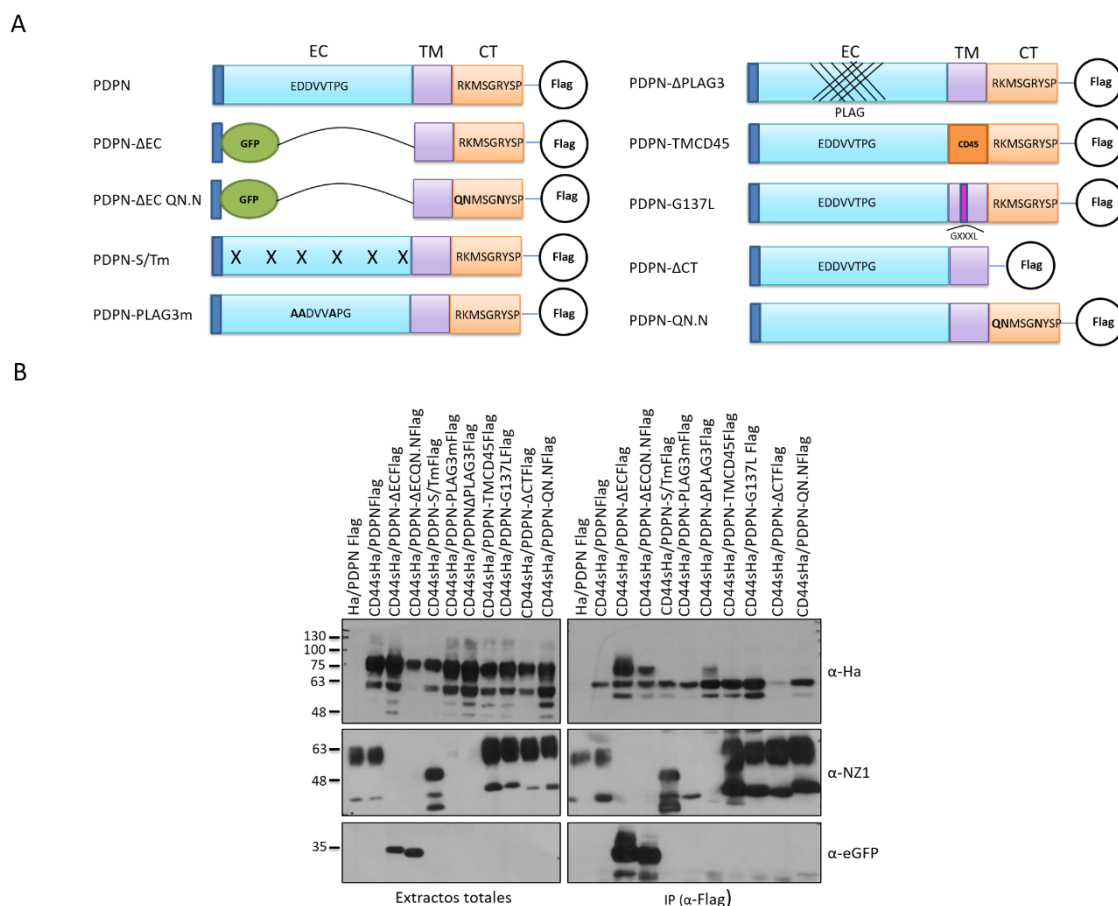


Figura 15. Los dominios citoplasmático y extracelular modulan la interacción de podoplanina con CD44. (A) Representación esquemática de las diferentes construcciones mutantes de podoplanina unidas al epítipo Flag empleadas en este estudio. Nótese que en las construcciones PDPN-ΔEC y PDPN-ΔECQN.N el dominio extracelular de podoplanina ha sido sustituido por GFP. **(B)** Ensayo de co-inmunoprecipitación en células HEK293T co-transfectadas con CD44s-Ha y las construcciones de los diferentes mutantes PDPN-Flag. IP: α-Flag, WB: α-Ha. Como controles negativos se utilizaron los plásmidos pcDNAHa y pcDNA3Flag sin modificar. En los paneles del lado izquierdo, se muestra la expresión de las diferentes construcciones en los lisados totales, empleando un anticuerpo anti-Ha para la detección de CD44s-Ha, NZ-1 para la detección de podoplanina y anti-GFP para la detección de los mutantes PDPN-ΔEC y PDPN-ΔECQN.N, que carecen del epítipo reconocido por el anticuerpo NZ-1. Nótese que la detección de los mutantes PDPN-ΔPLAG3 y PDPN-PLAG3m con el anticuerpo NZ-1 también se ve significativamente reducida como consecuencia de las mutaciones (paneles intermedios); no obstante, los mutantes PDPN-ΔEC y PDPN-ΔECQN.N, se detectan perfectamente con α-GFP (paneles inferiores). En el panel superior derecho se muestran los resultados de la co-inmunoprecipitación

Los resultados de este ensayo se muestran en la [Figura 15B](#). El mutante PDPN-ΔCT mostró una capacidad reducida de co-precipitar CD44s comparado con la proteína silvestre, lo que sugiere que el dominio citosólico de podoplanina está implicado en la interacción. Esta interacción no parece ocurrir por mediación de las proteínas ERM, ya que el mutante PDPN-QN.N, que es incapaz de unir ezrina y/o moesina ([Martín-Villar et al., 2006](#)), co-precipitó CD44s con la misma eficiencia que podoplanina. De la misma manera, la mutación G137L en el dominio transmembrana (PDPN-G137L), que inhibe la oligomerización de podoplanina en la membrana

RESULTADOS

y su incorporación a "lipid rafts" ([Fernández-Muñoz et al., 2011](#)), o la sustitución del dominio transmembrana completo por el de la proteína CD45 (PDPN-TMCD45), no afectaron significativamente a la interacción podoplanina-CD44s. No obstante, la delección del dominio EC (PDPN-ΔEC), no sólo aumentó el nivel de co-precipitación con CD44s, sino que favoreció el arrastre de formas de mayor tamaño molecular que, probablemente, corresponden a formas con mayor grado de glicosilación. Este dato sugiere que la glicosilación del dominio extracelular de podoplanina modula negativamente la interacción con CD44s. La incapacidad de PDPN-ΔEC para unir proteínas ERM (PDPN-ΔECQN.N) no afectó la co-precipitación de formas CD44s de mayor tamaño, como tampoco lo hizo la delección del dominio PLAG3 (PDPN-ΔPLAG3) Implicado en la interacción con la proteína plaquetaria CLEC-2. Sin embargo, en contraste con el mutante PDPN-ΔEC, la mutación al azar de residuos S y T potencialmente glicosilables (PDPN-S/Tm) mostró un patrón de co-precipitación similar al de la proteína silvestre, lo que sugiere que, bien la glicosilación de podoplanina no afecta a la interacción, o bien que la glicosilación de esos residuos en particular no es relevante para su asociación con CD44s.

2.4 La glicosilación del dominio extracelular de podoplanina modula negativamente su interacción con CD44

Debido a que las mutaciones en S y T efectuadas en la construcción PDPN-S/Tm no tuvieron ningún efecto en la interacción podoplanina-CD44s, decidimos analizar en la secuencia de podoplanina otros residuos que pudieran ser responsables de su glicosilación y mutarlos. Según indican Kaneko y colaboradores ([Kaneko et al., 2007, 2006](#)) existen cuatro regiones dentro del dominio extracelular de podoplanina importantes para su glicosilación: 1) T52 dentro del dominio PLAG3, la cual mutamos por una alanina en la construcción PDPN-PLAG3Tm; 2) T58 dentro del dominio PLAG4 (PDPN-PLAG4Tm); 3) un conjunto de aminoácidos situados entre ambos motivos, que denominamos isla 1, en la cual se mutaron varios residuos T y S por alaninas (PDPN-I1); y 4) otra isla de glicosilación situada tras el motivo PLAG4, en la que se hizo lo mismo (PDPN-I2). Además, usamos dos construcciones en las que se mutaron las T de los motivos PLAG3 y PLAG4 (PDPN-PLAG3/4Tm) o los residuos S y T de las dos islas de glicosilación (PDPN-I1/2) ([Figura 16A](#)). Estas construcciones mutantes fusionadas al epítipo Flag, fueron co-transfectadas junto con CD44s-Ha, y llevamos a cabo los ensayos de co-inmunoprecipitación que se presentan en la [Figura 16B](#). Los resultados obtenidos indican que la glicosilación de las treoninas de los motivos PLAG3 y PLAG4 no afecta a la interacción PDPN-CD44s, ya que los mutantes PDPN-PLAG3Tm, PDPN-PLAG4Tm y PDPN-PLAG3/4Tm co-inmunoprecipitan con CD44s con igual eficiencia que podoplanina silvestre. Sin embargo, la glicosilación en los residuos S y T de la isla 1 parece modular negativamente la interacción, ya que el mutante PDPN-I1

arrastró en la co-inmunoprecipitación formas de mayor tamaño molecular de CD44s, al igual que ocurría con el mutante PDPN-ΔEC (véase la figura 15B). Un efecto similar, aunque más leve, se observó con el mutante PDPN-I2, en el que se mutaron simultáneamente cinco de los siete residuos S/T presentes. El mutante PDPN-I1/2 mostró un efecto sinérgico, lo que sugiere que la glicosilación tanto de la isla 1 como la de la isla 2, esta última en menor medida, regulan negativamente la interacción.

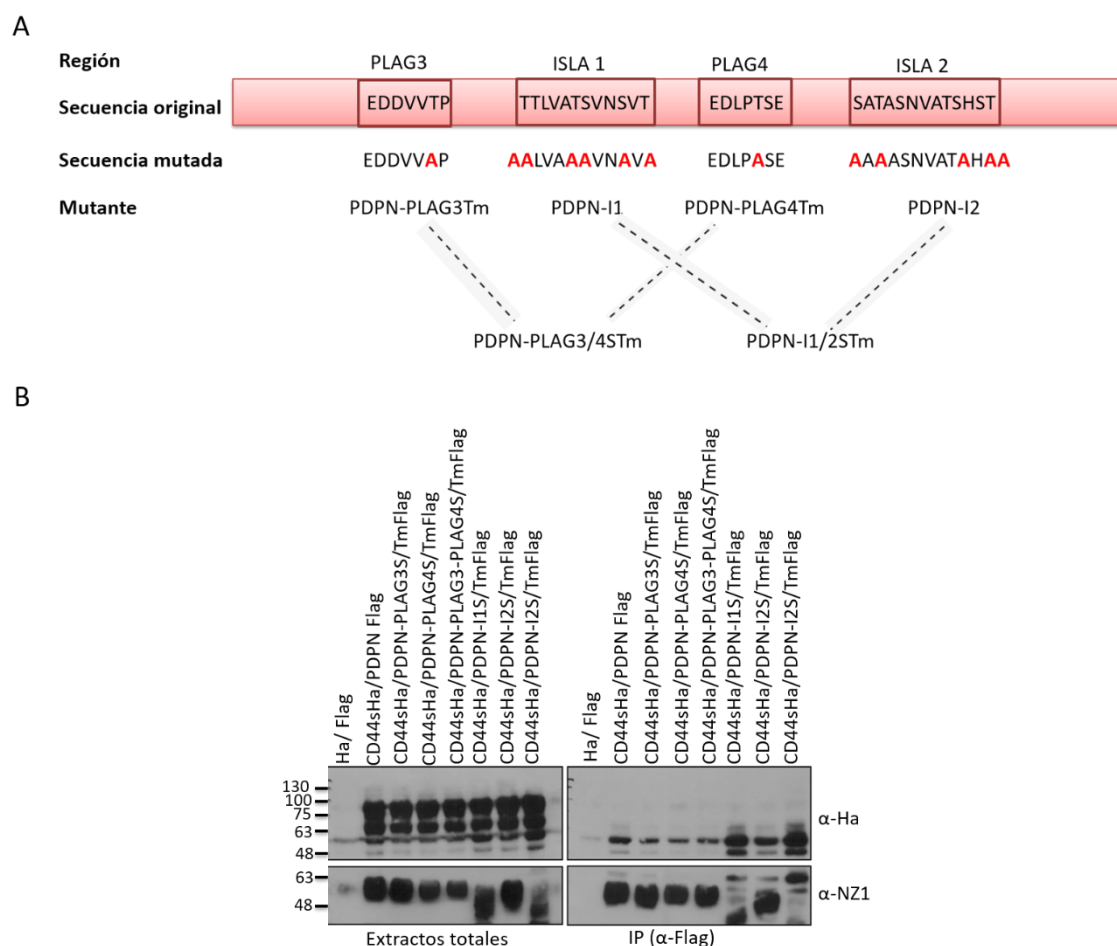


Figura 16. La interacción de podoplanina con CD44 se modula por la glicosilación del dominio extracelular de podoplanina. (A) Representación esquemática de los mutantes de glicosilación del dominio extracelular de podoplanina. **(B)** Ensayo de co-inmunoprecipitación en células HEK293T co-transfectadas con CD44s-Ha y las construcciones mutantes de podoplanina indicadas en el panel A etiquetadas con Flag. IP: α-Flag, WB: α-Ha. Se utilizan como controles negativos los plásmidos pcDNA3Ha y pcDNA3Flag sin modificar. La comprobación de que la inmunoprecipitación se había producido de forma correcta se presenta en los paneles inferiores, en los que se detectan las distintas proteínas PDPN con el anticuerpo NZ-1.

RESULTADOS

2.5 El dominio transmembrana de podoplanina es crítico para su interacción con CD44

Para completar el estudio de la implicación del dominio transmembrana de podoplanina en la interacción PDPN-CD44, además del mutante PDPN-TMCD45, utilizamos otras construcciones en las que sustituimos el dominio transmembrana de podoplanina por el de las proteínas: sinaptobrevina (PDPN-TMSYN), glicoforina A (PDPN-TMGPA) y el receptor ERBB2 (PDPN-TMERBB2) (Figura 17A). Los resultados del ensayo de co-inmunoprecipitación con estos mutantes muestran que al cambiar el dominio transmembrana de podoplanina por el de sinaptobrevina o glicoforina A, la interacción PDPN-CD44 se pierde. En el caso del mutante PDPN-TMSYN, la interacción disminuye de manera semejante a cuando se deletiona el dominio citoplasmático (véase la Figura 15B); sin embargo, en el caso de PDPN-TMGPA, la interacción desaparece casi por completo. Por otro lado, la sustitución por el dominio transmembrana de ERBB2 no afecta significativamente a la interacción. Estos resultados indican una implicación del dominio transmembrana de podoplanina en su interacción con CD44.

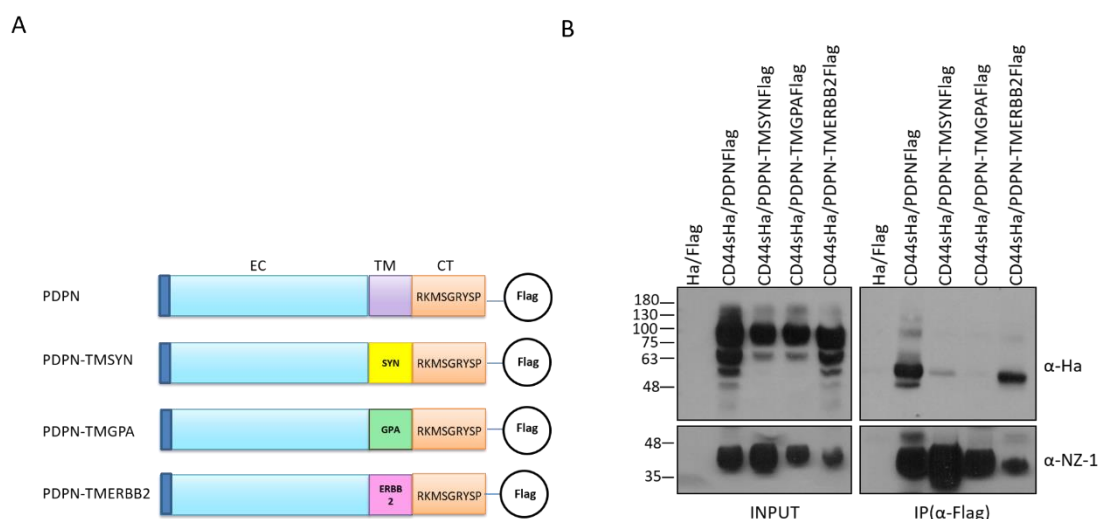


Figura 17. Implicación del dominio transmembrana en la interacción PDPN-CD44s. (A) Representación esquemática de las construcciones mutantes del dominio transmembrana (TM) de podoplanina empleadas en este estudio. **(B)** Ensayo de co-inmunoprecipitación en células HEK293T co-transfectadas con CD44s-Ha y los diferentes mutantes presentados en el panel A etiquetados con Flag. IP: α-Flag, WB: α-Ha. Se utilizaron como controles negativos los plásmidos pcDNA3Ha y pcDNA3Flag vacíos. Los paneles inferiores muestran los niveles de podoplanina en los extractos totales y los inmunoprecipitados detectados con el anticuerpo NZ-1.

En conjunto, los resultados de la co-inmunoprecipitación sugieren que la interacción PDPN-CD44 en la membrana plasmática ocurre probablemente a través de sus dominios transmembrana y requiere el dominio citoplasmático de podoplanina para su estabilidad. La glicosilación del dominio extracelular de podoplanina, particularmente la glicosilación de las S y T localizadas en las denominadas islas 1 y 2 regula negativamente la interacción, impidiendo que

las formas más glicosiladas de CD44 se unan a podoplanina, probablemente por la repulsión ejercida debido a las cargas negativas aportadas por el ácido siálico unido a la cadena de azúcar ([Renart et al., 2015](#); [Scholl et al., 1999](#)).

3. ESTUDIO DE LA RELEVANCIA DE LA INTERACCIÓN PODOPLANINA-CD44 EN LA FORMACIÓN DE INVADOPODIOS ACTIVOS Y EN LA INVASIÓN DE LAS CÉLULAS SCC A TRAVÉS DE LA MEMBRANA BASAL

3.1 Podoplanina, CD44s y CD44v se localizan en el anillo de adhesión de los invadopodios

Una vez confirmada la interacción entre podoplanina y las isoformas de CD44, estudiamos el papel funcional de esta interacción en la invasión tumoral. Como ya se ha descrito anteriormente (véase la Introducción), podoplanina se localiza en el anillo de adhesión de los invadopodios de células SCC, y modula su estabilidad y actividad proteolítica ([Martín-Villar et al., 2015](#)). Por otro lado, se ha descrito que CD44s, pero no CD44v, es un componente fundamental para la formación y actividad de los invadopodios de células de cáncer de mama ([Zhao et al., 2016](#)). Con estos antecedentes, nos planteamos estudiar si la interacción entre podoplanina y CD44s y/o CD44v es relevante para la actividad funcional de estas estructuras y, como consecuencia, para la capacidad invasiva de las células de SCC.

Como modelo seleccionamos la línea celular HN5, debido a la alta expresión de CD44 y podoplanina que presenta y a su eficiencia para formar invadopodios de forma constitutiva. En primer lugar, analizamos la co-localización de CD44 endógeno y podoplanina fusionada a eGFP en los invadopodios de células HN5 sembradas sobre gelatina mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal. Como se observa en la [Figura 18](#), ambas proteínas co-localizan (tinción amarilla en el panel de superposición) en el anillo de adhesión que rodea a los haces (“puncta”) de F-actina (tinción azul) característicos de los invadopodios.

Posteriormente, investigamos si las diferentes isoformas de CD44v aisladas en nuestro modelo de SCC siguen este mismo patrón de localización o, si por el contrario, esta localización es específica de alguna isoforma concreta, como ha sido sugerido anteriormente ([Zhao et al., 2016](#)). Para ello, utilizamos células HN5 que expresaban de manera estable Lifeact-Rubby (un péptido de 17 aminoácidos empleado para visualizar F-actina en la célula viva) transfectadas con las construcciones CD44s, CD44v3-10, CD44v6-10 y CD44v8-10 fusionadas a eGFP. La localización de cada una de estas proteínas en invadopodios se analizó mediante microscopía confocal en células vivas, sembradas sobre gelatina. Como se observa en la [Figura 19](#), CD44s y todas las isoformas CD44v están presentes en el anillo de adhesión de los invadopodios. Sin embargo, en el caso de CD44v3-10 observamos dos patrones de localización diferentes. Mientras que en algunos grupos de invadopodios su localización estaba restringida al anillo de

adhesión (panel inferior correspondiente a CD44v3-10), en otros invadopodios la localización era mucho más difusa (panel superior). Estos resultados sugieren que, al igual que podoplanina, las isoformas CD44s y CD44v se incorporan al anillo de adhesión de los invadopodios, aunque con diferente afinidad, como ocurre en el caso de CD44v3-10.

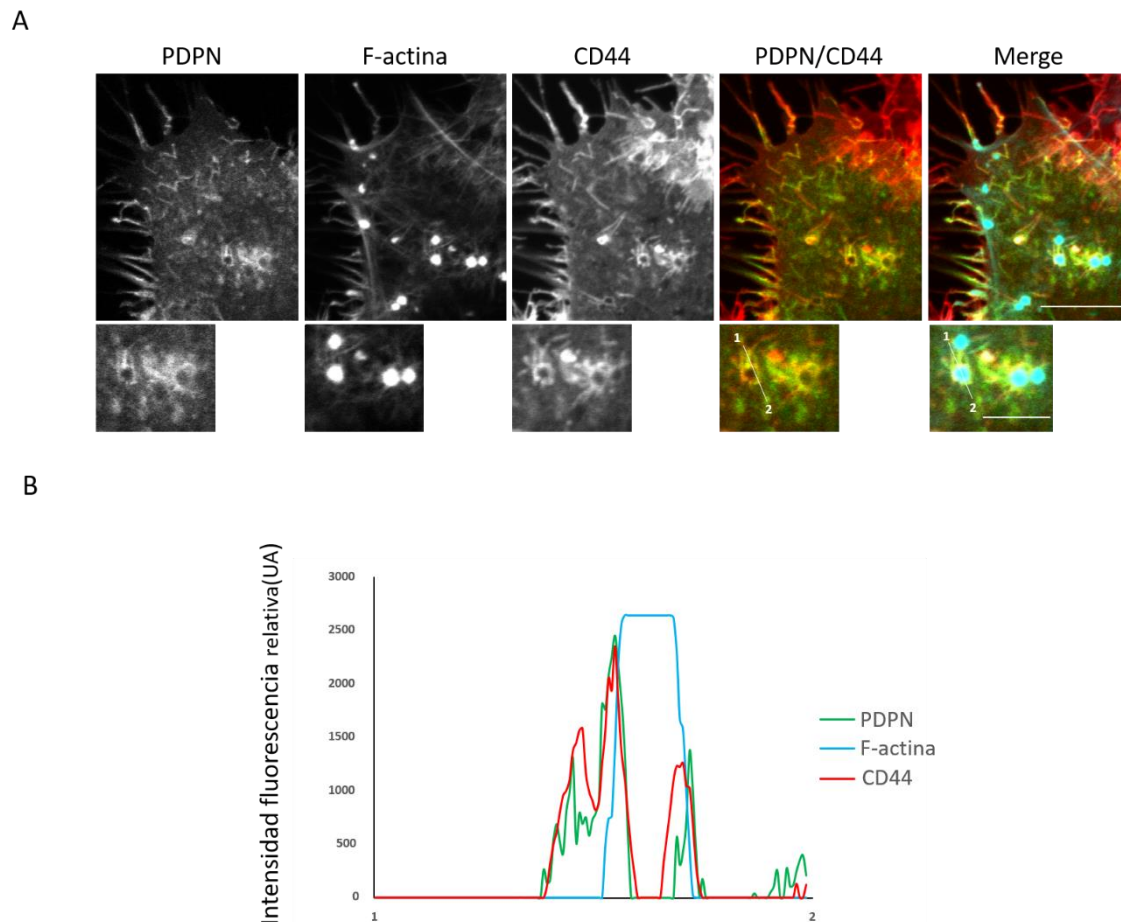


Figura 18. CD44 colocaliza con podoplanina en el anillo de adhesión de los invadopodios de células SCC. (A) Células HN5 transfectadas con podoplanina fusionada a GFP (PDPN-GFP) fueron sembradas sobre cubres recubiertos de gelatina durante 6h. Tras fijar y permeabilizar las células se tiñeron con faloidina-Alexa 647 para visualizar las “puncta” de F-actina (azul). La localización de CD44 y podoplanina en los invadopodios se analizó mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal, visualizando directamente PDPN-GFP y utilizando un anticuerpo que reconoce todas las isoformas de CD44 (E1.2/8). Barra = 10 μ m, magnificaciones 5 μ m. En los paneles inferiores se presentan magnificaciones con algunos invadopodios individuales. **(B)** En el panel inferior se presentan los perfiles de intensidad de fluorescencia relativa (en unidades arbitrarias) correspondientes a las distintas proteínas, trazados a lo largo de la línea 1-2 representada en las magnificaciones del panel A.

RESULTADOS

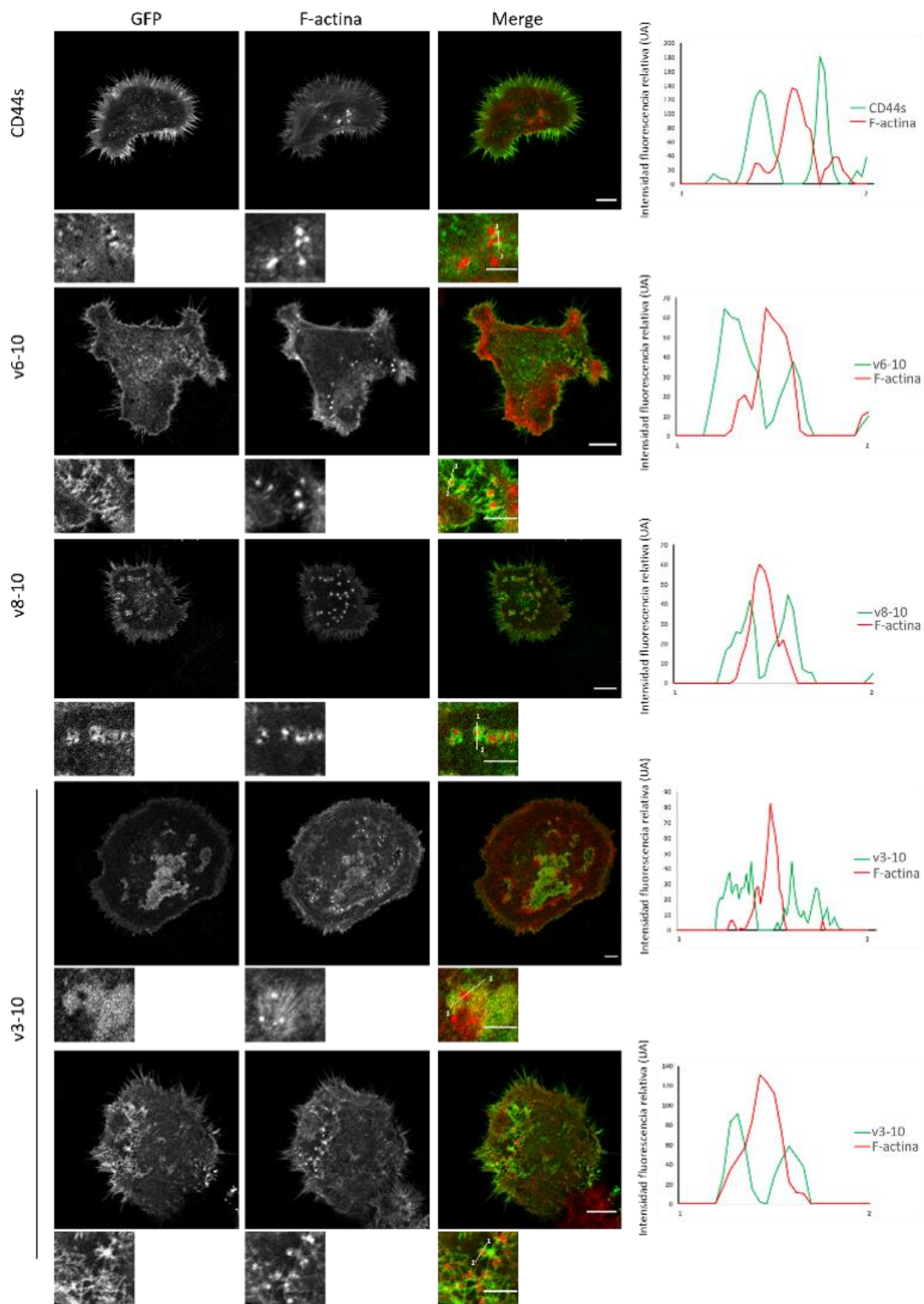


Figura 19. Localización de las isoformas CD44s y CD44v en los invadopodios de células de SCC. Se sembraron células HN5-Lifeact-Rubby transfectadas transitoriamente con construcciones CD44s, CD44v3-10, CD44v6-10 y CD44v8-10 fusionadas a eGFP sobre cubres recubiertos con gelatina, durante 3h. Posteriormente, se analizó la localización de las distintas isoformas en relación con las “punta” de F-actina mediante microscopía confocal. En los paneles inferiores se presentan magnificaciones de invadopodios individuales. Barras = 10 μ m, magnificaciones 5 μ m. En los paneles de la derecha se representan los perfiles de intensidad de fluorescencia relativa (en unidades arbitrarias) de CD44-GFP con respecto a Lifeact-Rubby trazados a lo largo de las líneas 1-2 presentes en las magnificaciones.

3.2 Podoplanina y CD44 cooperan para promover una actividad proteolítica eficiente de los invadopodios

Para analizar la implicación de podoplanina y CD44 en la formación, estabilidad y actividad proteolítica de los invadopodios, las células HN5 se transfectaron con siRNAs específicos de cada una de las proteínas con el fin de silenciar de forma individual o simultánea ambas proteínas. Para cada una de ellas, se empleó una mezcla de dos siRNAs específicos que silencian eficazmente (90-95%) la expresión de podoplanina o de todas las isoformas de CD44 (Figura 20A). El impacto funcional de la expresión de podoplanina y/o CD44 sobre los invadopodios de células de SCC se evaluó mediante ensayos clásicos de degradación de gelatina, en los que las células son sombreadas sobre cubreobjetos recubiertos de gelatina fluorescente (gelatina-TRITC). En este tipo de ensayos la actividad de los invadopodios se visualiza por la aparición de regiones negras (sin fluorescencia), sobre las que se localizan los “puncta” de F-actina, característicos de los invadopodios.

Como indican nuestros resultados representados en la Figura 20, las células deficientes en podoplanina que mantienen la expresión de CD44 (HN5-siPDPN) muestran una clara disminución en la proporción de células con invadopodios activos, en el número de invadopodios activos por célula, y en el área de degradación asociada a invadopodios por célula (un tipo de degradación focal restringida a las proyecciones dinámicas de los invadopodios) con respecto a las células parentales y a las células control (HN5-siControl). Estos resultados son coherentes con resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio (ref paper podoinvadopodia). Sin embargo, estos parámetros no se ven alterados tras el silenciamiento de CD44 (HN5siCD44). Las células HN5siCD44 muestran, además, un patrón anómalo de degradación de la gelatina, más difuso y deslocalizado que la degradación focal asociada a invadopodios observada en las células parentales y control (Figura 20B). Tanto la proporción de células que muestran este tipo de degradación aberrante como el área de degradación anómala por célula aumentan significativamente en las células HN5siCD44 con respecto a las células HN5siPDPN y control (Figura 20F, G). Curiosamente, tras el silenciamiento simultáneo de ambas proteínas (HN5siPDPN-CD44), las células se comportan de manera similar a las HN5siPDPN (Figura 20C-G), lo que indica un papel preponderante de podoplanina en la formación de invadopodios activos, aunque CD44 parece ser necesaria para mantener un control espacial de la actividad proteolítica.

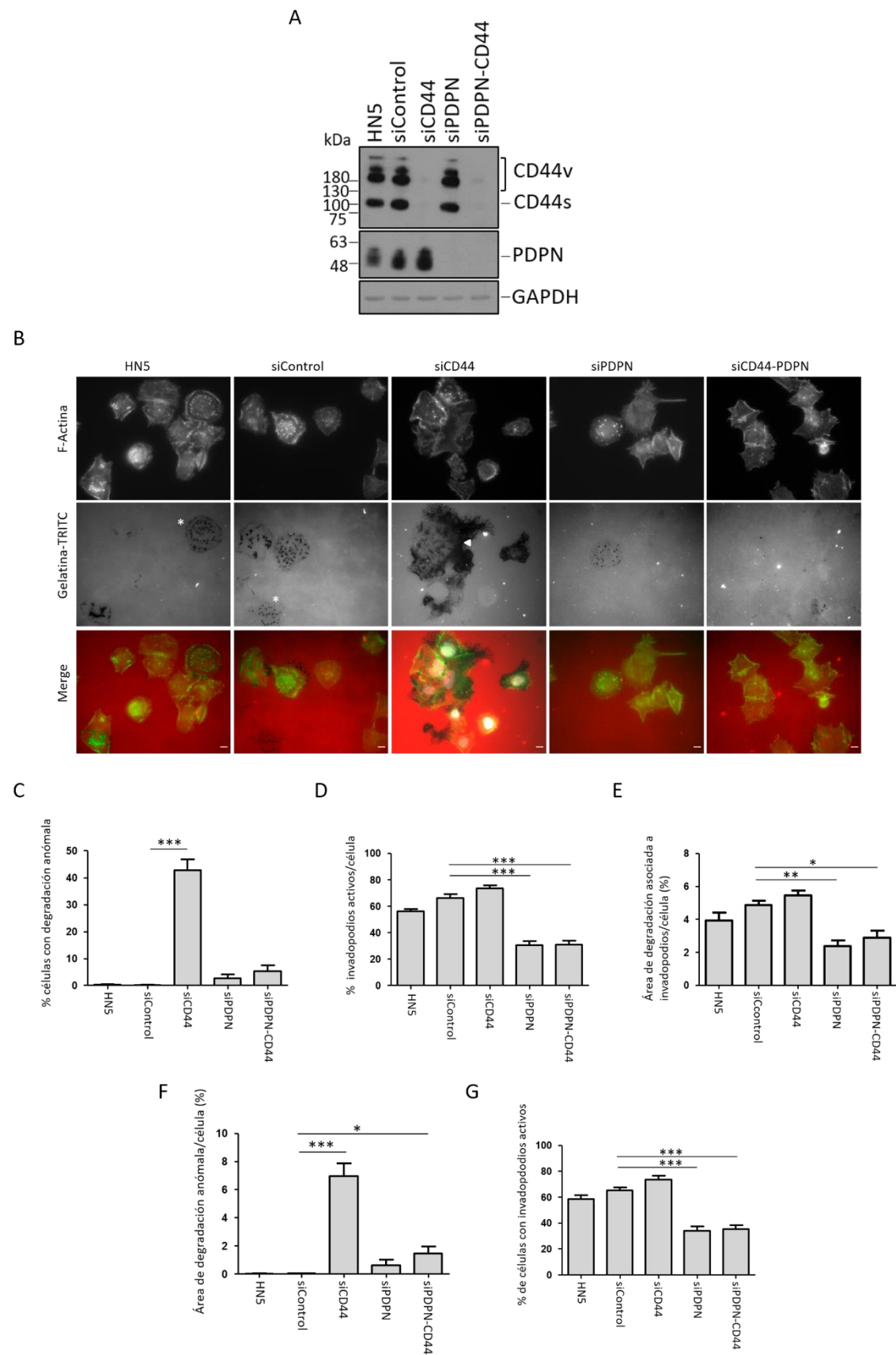


Figura 20. Implicación de podoplanina y CD44 en la formación de invadopodios activos. (A) Análisis mediante Western blot del efecto del tratamiento de células HN5 con siRNAs específicos en la expresión de podoplanina y CD44. GAPDH fue usado como control de carga. (B) Determinación de la formación de invadopodios activos mediante un ensayo de degradación de gelatina. Las células se sembraron en portas recubiertos de gelatina fluorescente (gelatina-TRITC, rojo) durante 6 horas. Se muestran imágenes de fluorescencia representativas. La F-actina se visualizó mediante tinción con faloidina-Alexa 488 (verde). (C) Cuantificación de la proporción de células con dos o más invadopodios activos, con respecto al número de total de células. (D) Cuantificación de la proporción de invadopodios activos, con respecto al número total de invadopodios por célula. (E) Cuantificación del área de degradación focal asociada a invadopodios por célula, con respecto al área total de la célula. (F) Cuantificación de la proporción de células con degradación anómala (difusa), con respecto al número total de células. (G) Cuantificación del área de degradación anómala por célula, con respecto al área total de la célula. Los datos de las gráficas corresponden a los valores medios \pm error estándar tras la observación de un número significativo de células ($n \geq 100$) en tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante el test ANOVA (** $P < 0.0001$; * $P < 0.001$; * $P < 0.005$).

3.3 Podoplanina, pero no CD44, regula la estabilidad de los invadopodios

Nuestro laboratorio ha descrito previamente que podoplanina regula la estabilidad de los invadopodios en células de SCC, lo que promueve una degradación de la matriz extracelular muy eficiente (Martín-Villar et al., 2015). La aparición de la degradación anómala tras el silenciamiento de CD44 no puede explicarse por un aumento del número de invadopodios activos por célula (Figura X13), sin embargo, podría ser debido a un aumento en la dinámica de los invadopodios o a alteraciones en su estabilidad. Para analizar la implicación de podoplanina y/o CD44 en la estabilidad de los invadopodios, las células HN5-Lifeact-Rubby fueron tratadas con siRNAs específicos para ambas proteínas, y la dinámica (formación y desaparición) de estas estructuras se analizó mediante la obtención de imágenes de células vivas a tiempo real (“live-cell imaging”). En la Figura 21A, se muestran algunos ejemplos para los distintos tratamientos. Los resultados obtenidos tras analizar un número significativo de invadopodios sugieren que el silenciamiento de podoplanina, pero no el de CD44, disminuye la vida media de los invadopodios (Figura 21B), así como la proporción de invadopodios más estables (con lapsos de vida superiores a 20 min), mientras que aumenta la proporción de invadopodios menos estables (con lapsos de vida de 0-10 min y 10-20 min) (Figura 21C). En las células deficientes en podoplanina (HN5siPDPN), se observa también una disminución del número de invadopodios por célula, aunque esta reducción no es significativa estadísticamente (Figura 21D). El silenciamiento simultáneo de podoplanina y CD44 produce, de nuevo, un fenotipo similar al de HN5siPDPN (Figura 21A-D). Estos resultados confirman una función clave de podoplanina en promover la estabilidad de los invadopodios (Martín-Villar et al., 2015), e indican que CD44 no está implicado en la formación de invadopodios estables. El hecho de que al silenciar ambas proteínas el fenotipo predominante sea el de podoplanina, podría indicar que la actividad/función de CD44 en los invadopodios entra en juego una vez que estas estructuras tienen ya cierta estabilidad, y está probablemente asociada con el reclutamiento de metaloproteasas a los invadopodios.

RESULTADOS

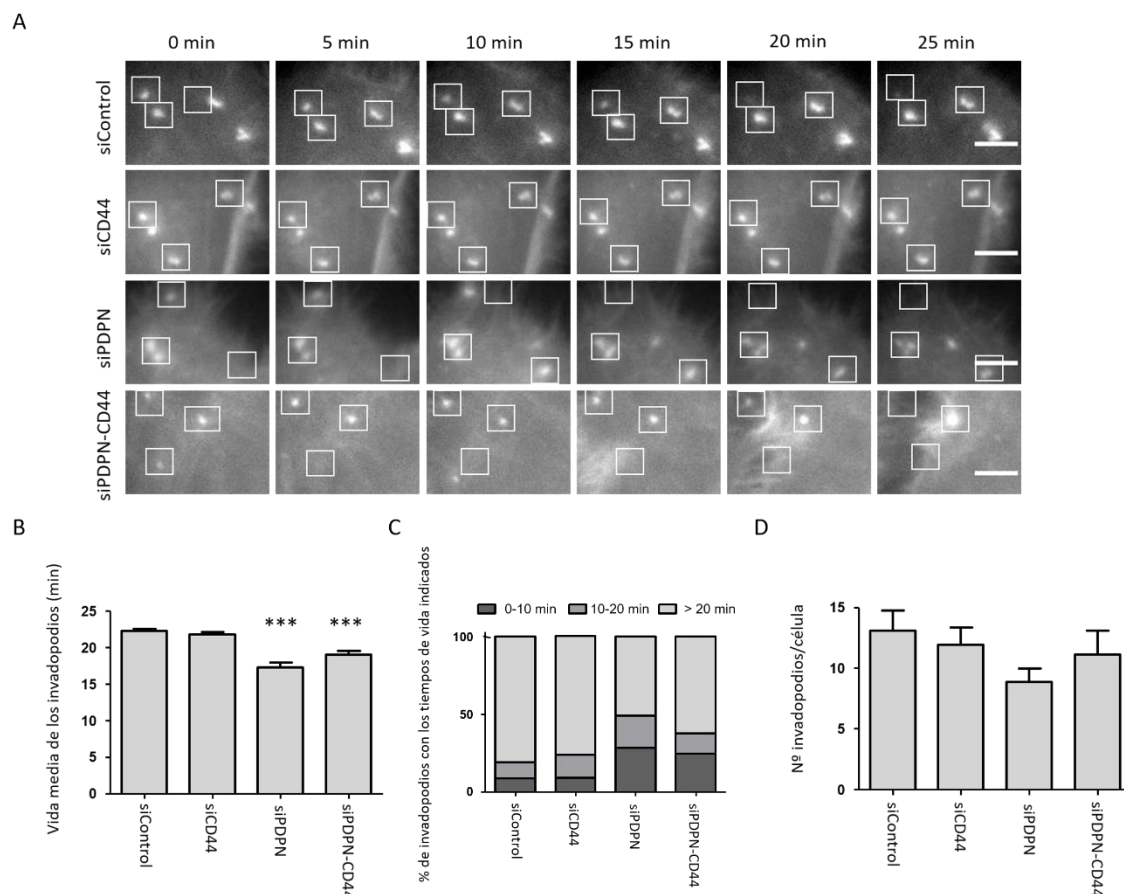


Figura 21. Podoplanina, y no CD44, regula la estabilidad de los invadopodios. (A) Secuencia de imágenes de microscopía de células HN5-Lifeact-Rubby tratadas con siRNAs control o específicos de podoplanina y/o CD44. Las células se cultivaron en portas recubiertos con gelatina y se tomaron imágenes cada 30 segundos durante 3 horas. Los recuadros muestran áreas amplificadas de invadopodios a lo largo del tiempo. (B) Cuantificación de la vida media de los invadopodios de las distintas líneas celulares. (C) Cuantificación de la proporción de invadopodios con períodos de vida estable (> 20 min), intermedios (10-20 min) y lábiles (0-10 min). (D) Cuantificación del número total de invadopodios por célula. Los datos de las gráficas corresponden a los valores medios \pm error estándar obtenidos de la observación de un número significativo de invadopodios ($n \geq 70$) en cinco células por condición, durante tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante el test ANOVA (***) $P < 0.0001$). Barra = 10 μ m.

3.4 La expresión de isoformas CD44 individuales en células CD44-deficientes rescata el fenotipo de degradación anómala de la MEC

Para analizar si el fenotipo de degradación anómala de la matriz observado en células CD44-deficientes dependía de alguna isoforma en particular, las células HN5 se infectaron con lentivirus que expresaban las isoformas CD44s, CD44v3-10 y CD44v8-10 fusionados a GFP. Posteriormente, en las células infectadas con cada una de las isoformas, se silenció la expresión de CD44 endógeno mediante interferencia con un siRNA que no produce el silenciamiento de las isoformas de CD44 exógenamente expresadas. Mediante esta estrategia obtuvimos células

que expresaban niveles significativos de cada una de las isoformas mencionadas de forma específica (Figura 22), aunque la expresión de CD44s fue siempre algo mayor que la de CD44v3-10 y CD44v8-10. Por otro lado, como se observa en la Figura 22, ninguno de los tratamientos afectó a los niveles de podoplanina. Este procedimiento se realizó también con la isoforma CD44v6-10, pero por razones desconocidas no obtuvimos células que expresaran niveles razonables de CD44v6-10GFP tras la infección lentiviral.

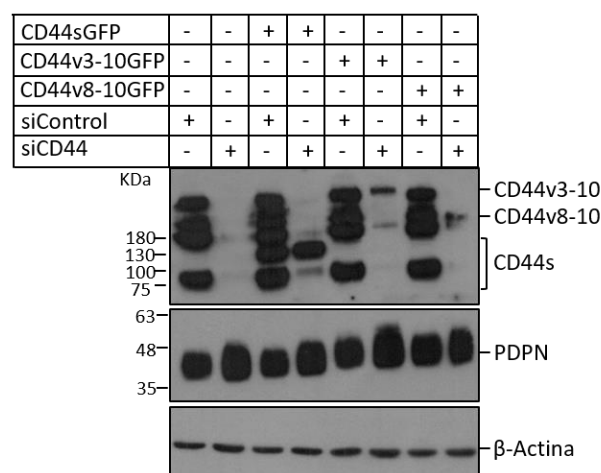


Figura 22. Expresión de isoformas CD44 específicas en células CD44-deficientes. Las células HN5 se infectaron con sobrenadantes lentivirales generados en el laboratorio, portando las secuencias de las distintas isoformas de CD44 indicadas en la figura. Posteriormente, estas células se trataron con un siRNA diseñado para silenciar específicamente la expresión de CD44 endógeno (todas las isoformas). La eficiencia del silenciamiento y del rescate de la expresión de cada isoforma se evaluó mediante Western blot. Los niveles de expresión de podoplanina también se evaluaron mediante esta técnica. β -actina se utilizó como control de carga.

Posteriormente, llevamos a cabo experimentos de degradación de gelatina con las células que expresan las diferentes isoformas. En la Figura 23A, se presentan imágenes representativas de la degradación observada al sembrar las distintas líneas celulares sobre gelatina fluorescente. Las cuantificaciones del área de degradación anómala por célula con respecto al área total de la célula y de la proporción de células que desarrollan el tipo de degradación anómala se representan en las Figuras 23E y F, respectivamente. Tanto la expresión de CD44s como la de CD44v3-10 y CD44v8-10 disminuyeron estos parámetros de forma significativa, aunque la eficiencia del rescate fue mayor con CD44s y menor con CD44v3-10 (Figura 23E, F).

Asimismo, tanto el rescate con CD44s y CD44v8-10 (Figura 23 B, C y D), como la sobreexpresión individual de cada una de estas dos isoformas en las células HN5 (Figura 24) redujo la proporción de células con invadopodios activos, así como el número de invadopodios activos por célula, aunque en el caso de CD44v8-10 la diferencia no fue siempre significativa (Figura 24).

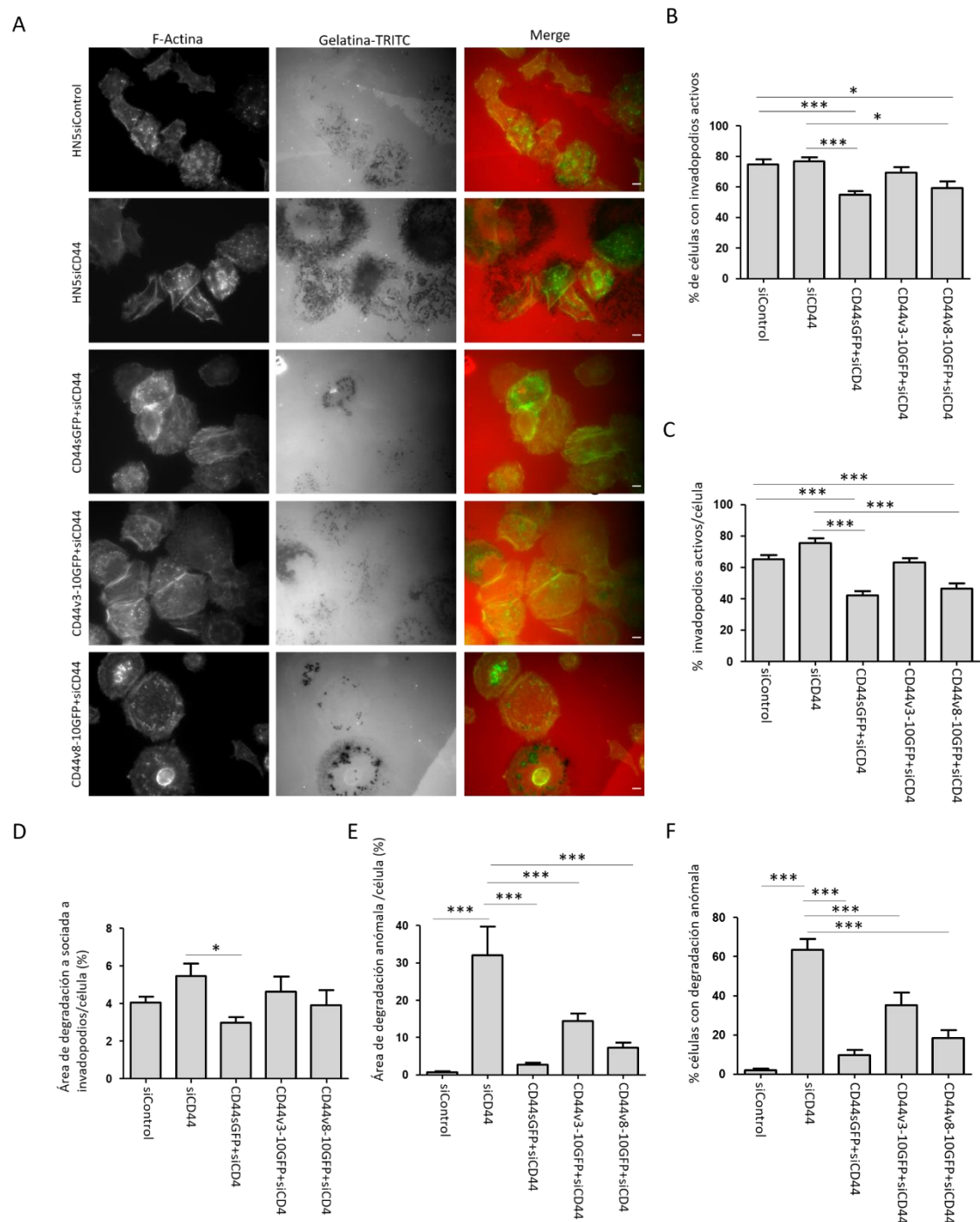


Figura 23. Rescate del fenotipo de degradación anómala de la MEC en células CD44-deficientes mediante la re-expresión de isoformas específicas. (A) Ensayo de degradación de gelatina de las distintas líneas celulares. Las células se sembraron en portas recubiertos con gelatina fluorescente (gelatina-TRITC, roja) durante 6h. Se muestran imágenes de fluorescencia representativas de las células control y de las células que re-expresan las isoformas indicadas de CD44. En las células que no expresaban proteínas fusionadas a eGFP se visualizó F-actina mediante tinción con Faloidina-Alexa 488 (verde), mientras que en las células que expresaban proteínas fusionadas a GFP la F-actina se visualizó mediante tinción con Faloidina- Alexa 647 (rojo lejano). **(B)** Cuantificación de la proporción de células con invadopodios activos respecto al número total de células. **(C)** Cuantificación de la proporción de invadopodios activos, con

respecto al número total de invadopodios por célula. **(D)** Cuantificación del área de degradación focal asociada a invadopodios por célula, con respecto al área total de la célula. **(E)** Cuantificación del área de degradación anómala (difusa) por célula, con respecto al área total de la célula. **(F)** Cuantificación de la proporción de células con degradación anómala con respecto al número total de células. Los datos de la gráfica corresponden a los valores medios \pm error estándar tras la observación de un número significativo de células ($n \geq 100$) en tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante el test ANOVA (** $P < 0.0001$).

Además, el área de degradación asociada a invadopodios no se vio afectada en el caso de CD44v8-10, mientras que si se vio reducida en el caso de CD44s. Estos resultados sugieren que CD44s es la principal isoforma implicada en la regulación de la actividad de los invadopodios, mientras que las isoformas variables son mucho menos eficientes, pudiendo llegar a compensar la función de CD44s en su ausencia. Asimismo, indican un efecto antagónico entre CD44s y podoplanina en la formación de invadopodios activos.

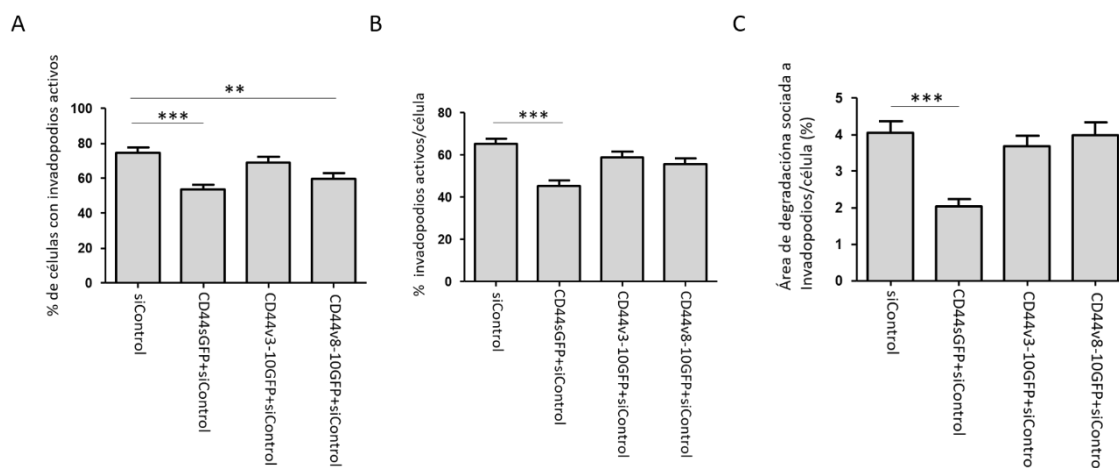


Figura 24. Efecto de la sobreexpresión de CD44s, CD44v3-10 y CD44v8-10 en células HN5 control en la formación de invadopodios activos. (A) Cuantificación de la proporción de células con invadopodios activos respecto al número total de células. **(B)** Cuantificación de la proporción de invadopodios activos respecto al número total de invadopodios por célula. **(C)** Cuantificación del área de degradación focal asociada a invadopodios por célula respecto al área total de la célula.

3.5 El silenciamiento de CD44 induce la formación de células binucleadas

En el curso de los experimentos de silenciamiento de CD44, observamos, además, que las células HN5-siCD44 mostraban un número anormal de células binucleadas ([Figura 25A](#)), que superaba del orden de 3-10 veces la pequeña proporción de estas células observada en las células HN5siControl y HN5-siPDPN ([Figura 25B](#)). Curiosamente, la proporción de células binucleadas se reducía a los niveles de las células control cuando se silenciaban simultáneamente CD44 y podoplanina ([Figura 25B](#)). Con el fin de determinar si este fenotipo era dependiente de alguna isoforma específica de CD44, analizamos también la proporción de células binucleadas en las células HN5-siCD44 que expresaban isoformas individuales de CD44 tras la infección lentiviral. Como se observa en la [Figura 25C](#), la expresión de CD44sGFP disminuyó el porcentaje de células binucleadas a niveles similares a las de las células control, mientras que la expresión de CD44v8-10GFP produjo sólo una reducción parcial, y la de CD44v3-10 no tuvo ningún efecto, indicando que CD44s es la principal isoforma responsable de este fenotipo.

3.6 Relevancia de la interacción podoplanina-CD44 en la invasividad de células SCC

Como se ha mencionado anteriormente, se considera que uno de los mecanismos por los que las células tumorales degradan y atraviesan la membrana basal en las primeras etapas de la invasión tumoral es, precisamente, mediante la formación de invadopodios ([Lohmer et al., 2014](#)). El patrón de degradación anómala encontrado al silenciar específicamente CD44 hizo que nos planteáramos si el aumento en el área de degradación anómala también correlaciona con una mayor capacidad de estas células para degradar una membrana basal nativa y migrar a través de ella. Para ello, llevamos a cabo ensayos de invasión *ex vivo*, en los que los filtros transwell son modificados de manera que la membrana porosa de poliestireno es sustituida por mesenterio de ratón, como se indica en Materiales y Métodos. Una vez procesados los transwells para de-celularizar el mesenterio, se sembraron células HN5 parentales, control, y silenciadas para podoplanina y/o CD44, y se evaluó la capacidad de estas células para degradar la membrana basal y su habilidad para atravesarla, mediante microscopía confocal, transcurridos 6 horas o 4 días. Para visualizar la membrana basal se empleó un anticuerpo específico frente a laminina 5, uno de los principales componentes de las membranas basales, y para visualizar las células se empleó faloidina.

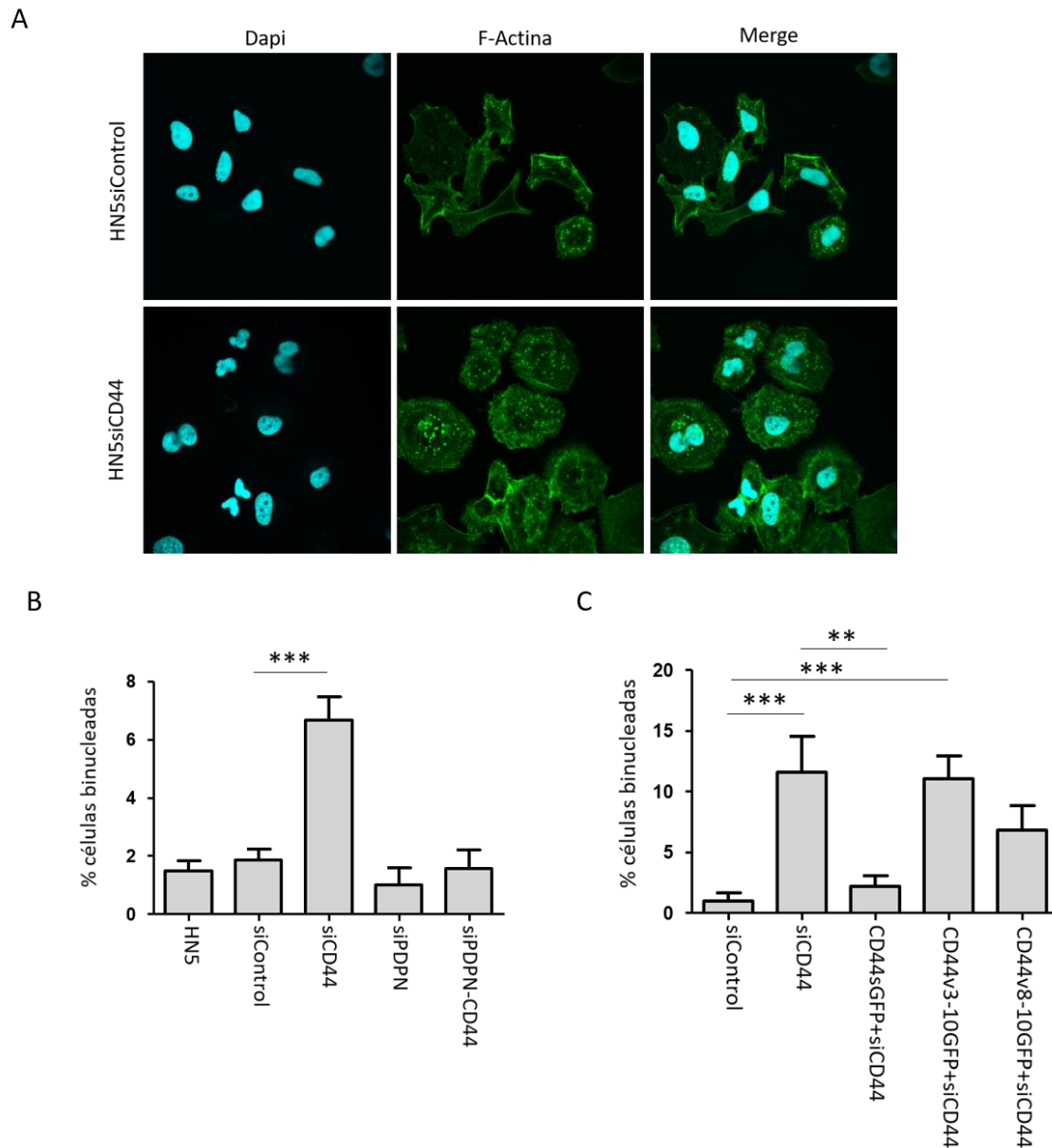


Figura 25. El silenciamiento de CD44 induce la formación de células binucleadas. (A) Imagen representativa de una célula HN5-siCD44 binucleada. F-actina se visualizó mediante tinción con Faloidina-Alexa 488 (verde). Los núcleos se tiñeron con DAPI (azul). (B) Cuantificación de la proporción de células binucleadas con respecto al número total de células en las líneas celulares indicadas. (C) Cuantificación de la proporción células binucleadas con respecto al número total de células en el experimento de rescate del fenotipo de degradación anómala de la MEC mostrado en la Figura X16. Los datos de las gráficas corresponden a los valores medios \pm error estándar tras la observación de un número significativo de células ($n \geq 100$) en tres experimentos independientes. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante el test ANOVA (***) $P < 0.0001$.

RESULTADOS

El grado de integridad de la membrana se estimó mediante la intensidad de fluorescencia acumulada a lo largo de todos los planos que engloban la membrana basal ([Figura 26B](#)), mientras que la proporción de células que migran a través de la membrana se evaluó midiendo la intensidad de fluorescencia correspondiente a las células que se encuentran en aquellos planos coincidentes con los planos inferiores de la membrana basal ([Figura 26C](#); véase [Materiales y Métodos](#)). Como se observa en la [Figura 26](#), tanto la degradación como la proporción de células que invaden la membrana basal transcurridas 6h, es prácticamente despreciable en todos los casos. Sin embargo, transcurridos 4 días, se observó un aumento significativo de la actividad proteolítica y de la capacidad invasiva en las células parentales y HN5siControl. El silenciamiento de podoplanina (HN5siPDPN) bloqueó completamente tanto la degradación de la membrana basal, como la capacidad invasiva de las células HN5, mientras que el silenciamiento de CD44 indujo cierto grado de degradación de la membrana basal (no significativo) que, sin embargo, no se asociaba con el porcentaje de células que migran a través de la membrana. Curiosamente, el silenciamiento simultáneo de ambas proteínas produjo, esta vez, un fenotipo más semejante al de las células HN5siCD44, aunque en ninguno de los casos la invasión de las células tumorales alcanzó los niveles de las células parentales o control.

En conjunto, estos resultados confirman el importante papel de la degradación mediada por invadopodios en la trans migración de la membrana basal, pues la alteración de la estabilidad de los invadopodios mediante el silenciamiento de podoplanina, prácticamente bloquea la degradación de la membrana basal y la trans migración de las células HN5. Además, el aumento de degradación observado en las células HN5siCD44 en los ensayos de degradación de gelatina no se correlaciona con una mayor capacidad de degradación de la membrana o de invasión celular. De hecho, aunque estas células parecen inducir la degradación de la membrana basal, este tipo de degradación no parece ser efectiva para permitir la trans migración de las células tumorales, o bien existen otros factores propios de las células HN5siCD44 (por ejemplo, el aumento de células binucleadas) que dificultan su migración.

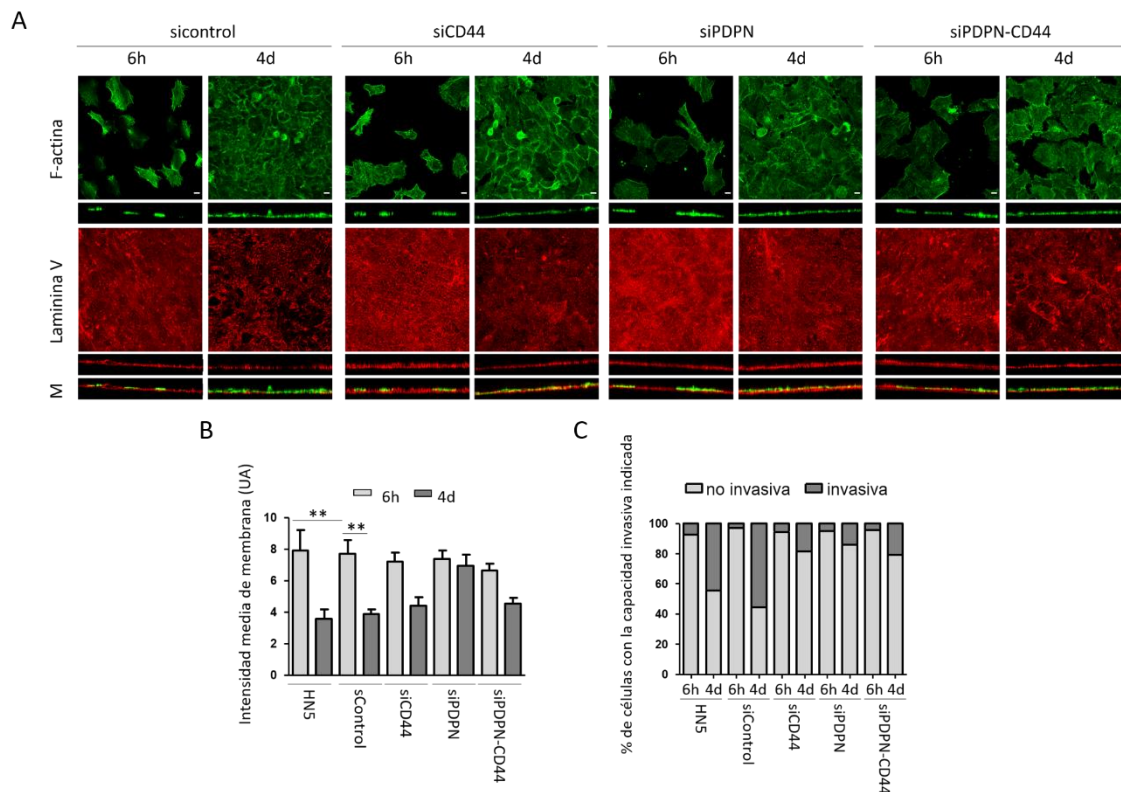


Figura 26. Efecto del silenciamiento de podoplanina y/o CD44 en la capacidad invasiva de células SCC a través de una membrana basal nativa. Células HN5 sin tratar y tratadas con los siRNAs indicados se sembraron en el compartimento superior de cámaras Transwell en las que el filtro inferior se había sustituido por una membrana de mesenterio de ratón. **(A)** Imágenes de microscopía confocal de las células teñidas con faloidina-Alexa 488 (verde) y de la membrana basal teñida con un anticuerpo anti-laminina (rojo) a las 6 horas y 4 días de la siembra. Los paneles superiores son proyecciones máximas X-Y. Los paneles inferiores son proyecciones X-Z mostrando el corte transversal con las células penetrando la membrana. **(B)** Cuantificación de la degradación efectuada por las distintas células midiendo la intensidad media de fluorescencia de la membrana en unidades arbitrarias. Los datos de la gráfica corresponden a los valores medios \pm error estándar tras la observación de 3-5 campos por membrana en 2-4 membranas. **(C)** Cuantificación de la proporción de células invasivas (que habían penetrado en la membrana) y no invasivas (que permanecían en la parte superior de la membrana) a los tiempos indicados, midiendo la intensidad de fluorescencia de las células (verde). Los datos de la gráfica se tomaron de los mismos ensayos que en el panel B. Barras = 10 μ m.

DISCUSIÓN

El SCC es uno de los cánceres de piel no-melanoma más comunes. A pesar de que la mayoría de los casos se curan con cirugía, existe un 5% de pacientes en los que se producen recidivas y metástasis a los 5 años, causando la muerte de los pacientes en el 80% de los casos (Goldie et al., 2019). Más complejo aún es el caso de los SCC originados en diferentes regiones de la cabeza y el cuello (HNSCC), pues este tipo de tumores además de ser también altamente invasivos, se diagnostican tarde, lo que hace que la enfermedad sea prácticamente incurable. Estos datos ponen de manifiesto la necesidad de conocer los mecanismos que conducen a la metástasis en este tipo de cáncer, para conseguir mejorar el diagnóstico y los tratamientos y, así, aumentar la supervivencia de los pacientes. En este trabajo, nos hemos centrado en investigar los mecanismos empleados por las células tumorales en las etapas iniciales de la invasión maligna: la degradación de la membrana basal y la trans migración de las células tumorales. Más concretamente, esta tesis ha pretendido dilucidar la función de dos glicoproteínas de membrana, podoplanina y CD44, que interaccionan entre sí, en la formación y estabilidad de los invadopodios de células de SCC y en la invasión tumoral. CD44 es además una familia de glicoproteínas muy heterogénea, debido a la existencia de numerosas isoformas, y a la presencia de diferentes tipos de modificaciones post-traduccionales, desde la clásica N- y O-glicosilación, hasta la adición de polisacáridos como el heparán sulfato. Aunque al igual que podoplanina, CD44 ha sido tradicionalmente asociada con la progresión maligna, muchos de los estudios llevados a cabo con esta molécula no tienen en cuenta esta heterogeneidad, lo que ha generado una gran controversia respecto a la implicación de las distintas isoformas en el cáncer (Ponta et al., 2003).

Nuestro trabajo parte de una base fisiológica, pues nuestros primeros resultados indican que ambas moléculas se expresan de una manera coordinada en procesos fisio-patológicos como la inflamación y el cáncer. El uso de modelos celulares *in vitro*, tanto humanos como murinos, nos ha permitido identificar las isoformas específicas de CD44 que se co-expresan con podoplanina en SCCs, caracterizar la interacción de podoplanina con CD44s, y demostrar también su asociación con varias isoformas variables de CD44. Finalmente, estudios funcionales *in vitro* y *ex vivo*, nos han permitido demostrar una nueva función de la asociación podoplanina-CD44 en el control espacial de la proteólisis mediada por invadopodios, y en la trans migración de la membrana basal por las células de SCC, proceso que requiere la formación de invadopodios estables. A continuación, discutiremos los resultados obtenidos para cada uno de los objetivos que hemos abordado en este trabajo.

Podoplanina se expresa conjuntamente con CD44s y CD44v durante la inflamación cutánea y el cáncer

El éster del forbol TPA induce de forma coordinada la expresión de podoplanina, CD44s y ciertas isoformas variables de CD44 en la piel murina. Esta inducción coincide con la hiperplasia de la epidermis producida por dicho estímulo pro-inflamatorio, lo que sugiere una posible cooperación funcional de podoplanina, no sólo con CD44s –como había demostrado previamente nuestro laboratorio- ([Martín-Villar et al., 2010](#)), sino también con CD44v, en procesos inflamatorios cutáneos y de remodelación de la epidermis. A favor de esta hipótesis, Shatirishvili y colaboradores muestran que la delección condicional de CD44 en queratinocitos basales de la epidermis altera la proliferación y diferenciación inducidas por TPA, y retrasa la cicatrización de heridas ([Shatirishvili et al., 2016](#)). Resultados de nuestro laboratorio apuntan a que los ratones deficientes de podoplanina en la epidermis tienen también alterada la respuesta hiperproliferativa y de diferenciación al TPA, aunque curiosamente los efectos parecen ser contrarios (Jarcovsky et al, resultados no publicados). La implicación específica de CD44s o CD44v en estos procesos no ha sido investigada, y dado que el tratamiento con TPA induce la expresión tanto de CD44v como de CD44s, resulta difícil inferir la función específica de cada una de ellas en estos procesos. En este sentido, sería interesante investigar la expresión de las distintas isoformas de CD44s en los ratones deficientes de podoplanina.

Podoplanina se expresa también conjuntamente con CD44v y CD44s en líneas celulares representativas de distintos estadios de progresión del modelo de la carcinogénesis de piel de ratón, aunque en estas células se observan cambios significativos en la expresión de las isoformas de CD44. Mientras que los niveles de CD44v son mayoritarios (respecto a los de CD44s) en células de papiloma y SCC con fenotipo epitelial (diferenciado), en células de SpCC con fenotipo fibroblástico (indiferenciado) ocurre un cambio (“switch”) CD44v-CD44s, en el que desaparecen las isoformas CD44v y los niveles de CD44s aumentan significativamente. Este cambio CD44v-CD44s también fue observado en nuestro laboratorio en un modelo de TEM inducida por podoplanina ([Martín-Villar et al., 2010](#)) y, de hecho, se considera un rasgo característico de la TEM ([Xu et al., 2015](#)), probablemente inducido por la proteína 1 epitelial reguladora del splicing (ESRP1) ([Preca et al., 2015](#)). No obstante, en la carcinogénesis *in vivo*, durante la progresión SCC-SpCC, los niveles de ambas isoformas CD44s y CD44v aumentan significativamente, en paralelo a un aumento de la expresión de podoplanina ([Martín-Villar et al., 2010](#)), por lo que el cambio CD44v-CD44s parece estar más relacionado con las TEM que ocurren *in vitro*.

Un hallazgo interesante de esta tesis es la identificación de CD44v10 (que contiene exclusivamente un único exón variable, v10) como la única isoforma CD44v asociada específicamente con el fenotipo SpCC. Resultados de nuestro laboratorio no recogidos en esta tesis, sugieren que la inducción de CD44v10 es, junto con el “switch” CD44v-CD44s, una característica de las TEM inducidas por los factores de transcripción Snail y Slug, y por la propia podoplanina, en células MDCK ([Ramos, 2018](#)). Sin embargo, queda por demostrar la presencia de esta isoforma en SpCCs inducidos durante la carcinogénesis *in vivo* y dilucidar si su expresión ocurre también durante las TEM en células y en SCC indiferenciados humanos. La presencia de isoformas que contienen el exón v10 se ha descrito en subpoblaciones de macrófagos, células Th1 activadas y células progenitoras hematopoyéticas ([Erb et al., 2014](#)). Estas isoformas muestran una afinidad reducida por hialuronato y, en tumores humanos, su expresión se ha asociado a una mayor resistencia a cis-platino en HNSCCs ([Wang and Bourguignon, 2011](#)). Sin embargo, en estos estudios no se identificaron las isoformas concretas que contenían este exón, por lo que las conclusiones que de ellos se derivan son aún limitadas. Una excepción es el trabajo de Beham-Schmid y colaboradores, que describieron la expresión de CD44v10 en linfomas de Hodgkin, asociada con recidivas y un mal pronóstico para los pacientes ([Beham-Schmid et al., 1998](#)).

En esta tesis, hemos identificado a CD44v3-10, CD44v6-10 y CD44v8-10 como las isoformas CD44v que se expresan preferentemente, junto a CD44s y podoplanina, en líneas celulares humanas de SCC. La expresión de estas isoformas se ha vinculado con la progresión maligna y/o quimioresistencia en distintos tipos de cáncer humano: CD44v3-10 en el cáncer de próstata ([Hao et al., 2010](#)), CD44v6-10 en adenocarcinomas de pulmón ([Lee et al., 2005](#)) y CD44v8-10 en cáncer de mama y cáncer gastrointestinal ([Choi et al., 2017](#); [Hiraga and Nakamura, 2016](#); [Lau et al., 2014](#)). En SCCs, se ha observado una expresión elevada de CD44v8-10 en SCC esofágicos tratados con quimioterapia, y más concretamente, en células madre/troncales cancerígenas, que son resistentes a la terapia, lo que se ha asociado con un mal pronóstico de la enfermedad ([Kagami et al., 2018](#)). También se ha descrito la presencia de CD44v3-10 (isoforma característica de los queratinocitos) en HNSCCs ([Reategui et al., 2006](#)), y se han identificado a isoformas que contienen el exón v3 como marcadores de células madre/troncales cancerígenas (CSCs) en este tipo de cáncer (véase más adelante). Curiosamente, un antiguo estudio identificó una disminución de los niveles de expresión de isoformas conteniendo el exón v3 en SCC orales pobremente diferenciados ([Hudson et al., 1996](#)). Estudios funcionales *in vitro* sugieren que, tanto las isoformas que contienen el exón v3 como las que contienen el v6, están asociadas con la progresión tumoral de HNSCCs,

DISCUSIÓN

estimulando el crecimiento, la migración y la expresión de metaloproteasas (MMPs) ([Wang and Bourguignon, 2011](#)).

En este trabajo, hemos identificado también, en células humanas SCC, la expresión de isoformas con el dominio citoplasmático truncado (CD44sC9 y CD44vC9). Aunque la presencia de estas isoformas se ha descrito en la literatura (Screaton et al., 1992), aún se desconoce su relevancia biológica. Es lógico pensar que el truncamiento del dominio citoplasmático altere la señalización intracelular inducida por CD44, así como su anclaje al citoesqueleto de actina por las proteínas ERM. A su vez, esto también podría afectar indirectamente, a las interacciones del dominio N-terminal con otras moléculas como hialuronato o algunos factores de crecimiento (Screaton et al., 1992). Por tanto, es probable que estas isoformas actúen como moduladores negativos de señalización mediada tanto por CD44s como por CD44v, algo que se investigará en el futuro.

Podoplanina interacciona con CD44s y CD44v en células SCC

Los estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal realizados en esta tesis sugieren un alto grado de co-localización de las isoformas CD44v3-10, CD44v6-10 y CD44v8-10 con podoplanina en la superficie de células SCC, particularmente en proyecciones de la membrana plasmática y contactos célula-célula, tal como habíamos descrito previamente para CD44s ([Martín-Villar et al., 2010](#)). Por otro lado, los ensayos de co-inmunoprecipitación indican una interacción física de todas estas isoformas con podoplanina, lo que parece ocurrir a través de los dominios transmembrana. La implicación de los dominios transmembrana en la interacción podoplanina-CD44 viene de experimentos en los que se sustituyó esta región de podoplanina por las de otras proteínas: CD45, sinaptobrevina, glicoforina A y ERBB2. Curiosamente, los dominios transmembrana de CD45 y ERBB2 no afectaron a la interacción podoplanina-CD44, mientras que los de sinaptobrevina y glicoforina A la inhibieron casi completamente. Esta observación sugiere que existen motivos o estructuras en el dominio transmembrana de podoplanina que son cruciales para su interacción con CD44, los cuales comparte con algunas proteínas, pero no con otras. Entre estos motivos, podemos descartar el GXXXG de la parte N-terminal, que está implicado en la oligomerización de podoplanina y su incorporación a balsas lipídicas ([Fernández-Muñoz et al., 2011](#)). Teniendo en cuenta que tanto CD44 como podoplanina residen en balsas lipídicas, este hecho favorece el que la interacción entre ambas proteínas ocurra en estas regiones de la membrana plasmática. De otra manera, si el motivo GXXXG estuviera implicado en la interacción con CD44, podría interferir en el reclutamiento de podoplanina a las balsas lipídicas, o, una vez incorporada podoplanina, podría

interferir con la unión a CD44. Actualmente, estamos investigando las secuencias y estructuras de las regiones transmembrana de podoplanina, CD44, CD45, sinaptobrevina, glicoforina A y ERBB2, para identificar los motivos comunes implicados en la interacción podoplanina-CD44.

La asociación de podoplanina con CD44 requiere también el dominio citoplasmático de podoplanina, ya que su delección inhibe significativamente su interacción con CD44, si bien esta no parece estar mediada por la unión de podoplanina y CD44 a proteínas ERM, una propiedad que les permite interaccionar con el citoesqueleto de actina. Un aspecto relevante de estos estudios es que la glicosilación del dominio extracelular modula negativamente la interacción podoplanina-CD44, de manera que las formas menos glicosiladas parecen interaccionar con mayor eficacia. Esto es lógico teniendo en cuenta la profusión de cargas negativas aportadas por el ácido siálico de los residuos S y T O-glicosilados que existen en los dominios extracelulares de ambas proteínas ([Ponta et al., 2003](#); [Renart et al., 2015](#)), los cuales ejercen una fuerza repulsiva entre ambas proteínas. En el caso de podoplanina, estos residuos parecen concentrarse en la llamada isla 1, situada entre los dominios PLAG3 y PLAG4, y, en menor medida, en la isla 2, detrás de PLAG4. Es importante señalar que las S y T glicosiladas presentes en los dominios PLAG3 y PLAG4, que median la interacción de podoplanina con la lectina CLEC-2 presente en plaquetas y células del sistema inmune ([Suzuki-Inoue et al., 2017](#)), no afectan a la interacción con CD44. No obstante, se ha sugerido una interacción mutuamente inhibidora de podoplanina con CLEC-2 o CD44 en células reticulares fibroblásticas, relacionada con la respuesta inmune ([Acton et al., 2012](#); [Winde et al., 2019](#)).

La interacción podoplanina-CD44 tiene, sin duda, relevancia biológica: ya nuestro laboratorio demostró que la interacción podoplanina-CD44s era crucial para que las células SCC pudieran migrar de una forma direccional y orientada ([Martín-Villar et al., 2010](#)), y en esta tesis se presentan datos (que discutiremos más adelante) que sugieren que podoplanina coopera con CD44s y CD44v para que las células SCC atraviesen de forma eficaz la membrana basal y para controlar la actividad proteolítica mediada por los invadopodios. Otro aspecto relacionado con el cáncer en el que la interacción podoplanina-CD44 podría tener relevancia es en la actividad funcional de las CSCs. CD44 es un marcador bien establecido de CSCs en distintos tipos de cáncer ([Orian-Rousseau, 2015](#); [Yan et al., 2015](#)), incluidos los HNSCCs. Como se ha mencionado anteriormente, el exón v3 se ha identificado como un marcador específico de CSCs en HNSCCs, y ha sido implicado en el mantenimiento de las propiedades “stemness”, en la resistencia de los tumores a quimioterapia y en la formación de metástasis en ganglios linfáticos ([Bourguignon et al., 2012](#); [Wang et al., 2007](#)). Por otro lado, podoplanina ha sido propuesto como un marcador de CSCs en SCC cervical ([Atsumi et al., 2008](#); [Miyashita et al., 2017](#)) y esofágico ([Islam et al.,](#)

DISCUSIÓN

2015; Rahadiani et al., 2010), así como en gliomas/glioblastomas (Dahlrot et al., 2013; Kolenda et al., 2011). Teniendo en cuenta estos antecedentes, sería importante analizar la relevancia funcional de la interacción podoplanina-CD44 en CSCs.

Por otro lado, ya que tanto podoplanina como CD44 se han identificado como componentes de exosomas, sería interesante investigar si los exosomas liberados por las células tumorales contienen complejos podoplanina-CD44, y si la asociación entre ambas proteínas está implicada en la linfangiogénesis estimulada por podoplanina presente en la superficie de las vesículas (Carrasco-Ramírez et al., 2016).

Además de su implicación en el cáncer, la interacción podoplanina-CD44 podría tener importancia en otros escenarios fisiológicos y patológicos, como la respuesta inmune, la inflamación y la fibrosis. A CD44 se le ha implicado en procesos inflamatorios asociados con enfermedades cardiovasculares y aterosclerosis (Krolkoski et al., 2019) y los ratones “knockout” de CD44 presentan una mayor respuesta inflamatoria y acumulación de colágeno fibrilar (Govindaraju et al., 2019). Por otro lado, a podoplanina se le ha implicado en enfermedades autoinmunes con inflamación crónica, como esclerosis múltiple, esclerosis sistémica y artritis reumatoide (revisado en (Quintanilla et al., 2019)). Podoplanina tiene una importante función en la respuesta inmune, ya que promueve la intravasación de las células dendríticas presentadoras de antígeno en los vasos linfáticos aferentes (que expresan podoplanina) y su migración a lo largo del endotelio linfático para alcanzar los ganglios (Acton et al., 2012; Tal et al., 2011). También se ha implicado a podoplanina en la expansión de los ganglios linfáticos (Astarita et al., 2015), un evento crítico durante la respuesta inmune adaptativa debido a la acumulación de linfocitos. Durante la iniciación de la respuesta inmune, las células dendríticas (que expresan CLEC-2) se unen a podoplanina presente en células reticulares fibroblásticas (que forman una densa malla por encima de la MEC que actúa como soporte de las células dendríticas y linfocitos T) para promover una rápida expansión de los ganglios. En relación con esto, de Winde y colaboradores han propuesto recientemente que la unión de CLEC-2 actúa como un interruptor molecular para cambiar la función de podoplanina en estas células, reduciendo la contractibilidad actina-miosina promovida por esta glicoproteína a través de la activación de Rho GTPasas, e induciendo la elongación y aplanamiento de los fibroblastos reticulares mediante su asociación con CD44 y la tetraspanina CD9 (Winde et al., 2019).

Relevancia de la asociación podoplanina-CD44 en la formación de invadopodios activos y en la invasión de células SCC a través de la membrana basal

Los resultados de este trabajo indican que tanto CD44s como las isoformas CD44v6-10, CD44v8-10 y CD44v3-10 son componentes de los invadopodios, localizados en el anillo de adhesión donde co-localizan con podoplanina. No obstante, con CD44v3-10 se observaron dos patrones de localización, uno coincidente con el de podoplanina y el de las otras isoformas, y otro más difuso y separado del núcleo de F-actina. Desconocemos las causas de esta diferencia, pero pueden deberse al gran tamaño de CD44v3-10, mayor que el de las otras isoformas (lo que podría determinar también un menor nivel de expresión en las células HN5 tras su transfección). Otra posibilidad, es que CD44v3-10 es la única isoforma de las tres CD44v que se modifica por heparán sulfato y otros glicosaminoglicanos, una propiedad que le confiere el exón v3 ([Wang and Bourguignon, 2011](#)), y las moléculas CD44v3-10 modificadas con glicosaminoglicanos podrían tener menor afinidad por el anillo de adhesión.

En general, la presencia de isoformas CD44v en los invadopodios de células SCC contrasta con los resultados de Zhao y colaboradores, que identificaron a CD44s, pero no a CD44v, como un componente de los invadopodios en células de cáncer de mama ([Zhao et al., 2016](#)). Esta discrepancia puede ser debida a que: 1) en líneas celulares de cáncer de mama podoplanina no está presente y, de hecho, los invadopodios de estas células no parecen tener un anillo de adhesión tan patente como en el caso de las células de SCC ([Martín-Villar et al., 2015](#)); y 2) en el estudio de Zhao y colegas tan sólo se analizó la localización de la isoforma CD44v3-10 en los invadopodios, que en nuestro caso parece ser la isoforma que en menor grado se asocia con invadopodios. Además, este estudio describe a CD44s como un componente del núcleo de F-actina, algo semejante a lo observado en podosomas de osteoclastos ([Chabadel et al., 2007](#)). Sin embargo, en nuestras células de SCC, tanto CD44 como podoplanina están específicamente asociados al anillo de adhesión de los invadopodios, pero nunca se han observado en el núcleo de F-actina. Estos resultados indican diferencias estructurales de los invadopodios dependiendo del tipo celular, lo que probablemente esté asociado con la estabilidad de estas estructuras y con el contexto celular. A favor de esta hipótesis, los invadopodios presentes en las células de cáncer de mama MDA-MB231 son más inestables que los de las células de SCC empleadas en este estudio ([Martín-Villar et al., 2015](#)). Aunque no se analizó en este trabajo, es probable que los requerimientos para la incorporación y estabilización de las isoformas de CD44 en el anillo de adhesión de los invadopodios sean

DISCUSIÓN

similares a los de podoplanina; es decir, su unión a proteínas ERM a través de los dominios citosólicos y su asociación con balsas lipídicas (Martín-Villar et al., 2010). A su vez, la propia asociación con podoplanina podría jugar un papel esencial en este sentido. Además, se ha descrito que CD44 puede asociarse con las integrinas $\alpha 4 \beta 1$, y, de esta manera, modular la señalización a través de Src y la quinasa de adhesión focal FAK (Zöller, 2011). Curiosamente, en células de cáncer de mama la integrina $\beta 1$ promueve la maduración y la actividad proteolítica de los invadopodios (Beaty et al., 2013). Sin embargo, se desconoce si esta integrina está presente en el anillo de adhesión de los invadopodios de células de SCC, algo que sería muy interesante investigar.

En cuanto a la implicación de podoplanina y CD44 en la formación y actividad de los invadopodios, nuestros resultados sugieren una función diferente, e incluso antagónica, para ambas moléculas. Mientras que el silenciamiento individual de podoplanina en células SCC disminuyó el número de invadopodios activos por célula y de células con invadopodios activos, el silenciamiento de CD44 no sólo no disminuyó estos parámetros, sino que se observó una tendencia a aumentarlos. Esta observación es congruente con los resultados obtenidos en los experimentos de rescate del fenotipo de degradación anómala de la gelatina producido por el silenciamiento de CD44, en los que la sobreexpresión de CD44s y, en menor medida, de CD44v, en células HN5 control y silenciadas, disminuyó el número de invadopodios activos. Estos datos sugieren un papel preponderante para podoplanina en la formación de invadopodios activos, que está en concordancia con su función estabilizadora demostrada previamente por nuestro laboratorio (Martín-Villar et al., 2015) y confirmada en esta tesis. CD44, por otra parte, no parece estar implicado en la estabilidad de estas estructuras. En el artículo mencionado anteriormente demostramos que podoplanina promueve la estabilidad de los invadopodios y una degradación más eficiente de la MEC mediante la activación de la ruta RhoC GTPasa-ROCK-LIMK-cofilina. No obstante, los resultados de esta tesis indican que podoplanina necesita a CD44 en el invadopodio para que su actividad proteolítica focal, restringida a los puntos de contacto con la MEC, no se desborde y se convierta en una proteólisis aberrante, desordenada, y, probablemente, menos eficaz. Es decir, podoplanina y CD44 cooperan para modular espacialmente la degradación de la MEC, lo que sugiere una función de la interacción podoplanina-CD44 en el control de la localización y/o secreción de las MMPs responsables de la actividad proteolítica de los invadopodios. La principal isoforma de CD44 implicada en esta función parece ser CD44s, mientras que las isoformas CD44v sólo son capaces de compensar parcialmente la ausencia de CD44s, como muestran nuestros experimentos de rescate del fenotipo de degradación anómala.

MT1-MMP es una metaloproteasa transmembrana esencial para la actividad proteolítica de los invadopodios (Artym et al., 2006), que se transporta a estas estructuras mediante vesículas procedentes de los endosomas tardíos (Castro-Castro et al., 2016). Una vez en los invadopodios, MT1-MMP debe estabilizarse, mediante mecanismos aún no bien establecidos, para ejercer su función. Uno de los mecanismos propuestos tiene su base en la proteína reguladora del citoesqueleto de actina N-WASP, pues puede promover el tráfico de vesículas que contienen MT1-MMP hacia la membrana plasmática, y a su vez, estabilizar a MT1-MMP anclando su dominio citoplasmático al citoesqueleto de actina (Yu et al., 2012). Li y colaboradores han descrito una interacción entre podoplanina y MT1-MMP en la membrana plasmática de células SCC, que promueve la invasión de estas células en coordinación con la activación de Rho GTPasas (Li et al., 2015). Asimismo, también se ha descrito que CD44 interacciona con MT1-MMP en la membrana plasmática (Kajita et al., 2001) y en los invadopodios (Zhao et al., 2016). La unión de CD44 a proteínas ERM (Tsukita et al., 1994) parece actuar como un anclaje de MT1-MMP al citoesqueleto de actina, y determina la localización de esta proteasa en el frente de avance de las células (Itoh and Seiki, 2006), aunque MT1-MMP también puede interaccionar directamente con proteínas de la familia ERM (Terawaki et al., 2015). Por otro lado, CD44 interacciona con N-WASP en células de cáncer de ovario (Bourguignon et al., 2007). Como se ha mencionado anteriormente, N-WASP es una proteína reguladora del citoesqueleto de actina que promueve su polimerización y la formación de proyecciones de la membrana plasmática, y es, además, reclutada por los invadopodios (Hoshino et al., 2013). Es, por lo tanto, concebible la formación de un complejo entre podoplanina, MT1-MMP y CD44 en el invadopodio, fuertemente anclado al citoesqueleto de actina a través de las proteínas ERM y/o NWASP. En este complejo, podoplanina promovería la estabilización del anillo de adhesión, controlando la actividad fragmentadora de F-actina de cofilina mediante la ruta que conduce a su fosforilación e inactivación (Martín-Villar et al., 2015). La presencia de CD44 sería clave para la correcta localización de MT1-MMP en el invadopodio (Figura 27). CD44 podría participar, también, en las primeras etapas del ensamblaje de los invadopodios (Petropoulos et al., 2018; Zhao et al., 2016), actuando como un sensor de señales de la MEC mediante su interacción con proteínas como ácido hialurónico y osteopontina (Petropoulos et al., 2018), y promoviendo la polimerización de actina a través de su interacción con N-WASP (Bourguignon et al., 2007) y cortactina (Zhao et al., 2016), cuya fosforilación promueve el reclutamiento de las proteínas reguladoras N-WASP y Arp2/3 necesarias para la formación de las “puncta” de F-actina. Sin embargo, el hecho de que, en nuestras células de SCC el silenciamiento de CD44 no altere significativamente el número de invadopodios activos, pero sí el patrón de degradación, sugiere que CD44 no interviene en las etapas iniciales de la

DISCUSIÓN

formación de invadopodios sino en el reclutamiento de las metaloproteasas. Además, se ha descrito que el invadopodio es un sitio preferente para la liberación de exosomas que contienen MT1-MMP y otras MMPs, y que existe una dependencia recíproca entre la producción de exosomas y la formación de invadopodios activos (Hoshino et al., 2013). Puesto que los estudios de nuestro laboratorio sugieren que podoplanina está implicado en el tráfico vesicular y promueve la formación de exosomas (Carrasco-Ramírez et al., 2016), sería interesante investigar si podoplanina actúa como un mediador de esta relación sinérgica entre invadopodios y exosomas y el papel que juega CD44 en esta relación.

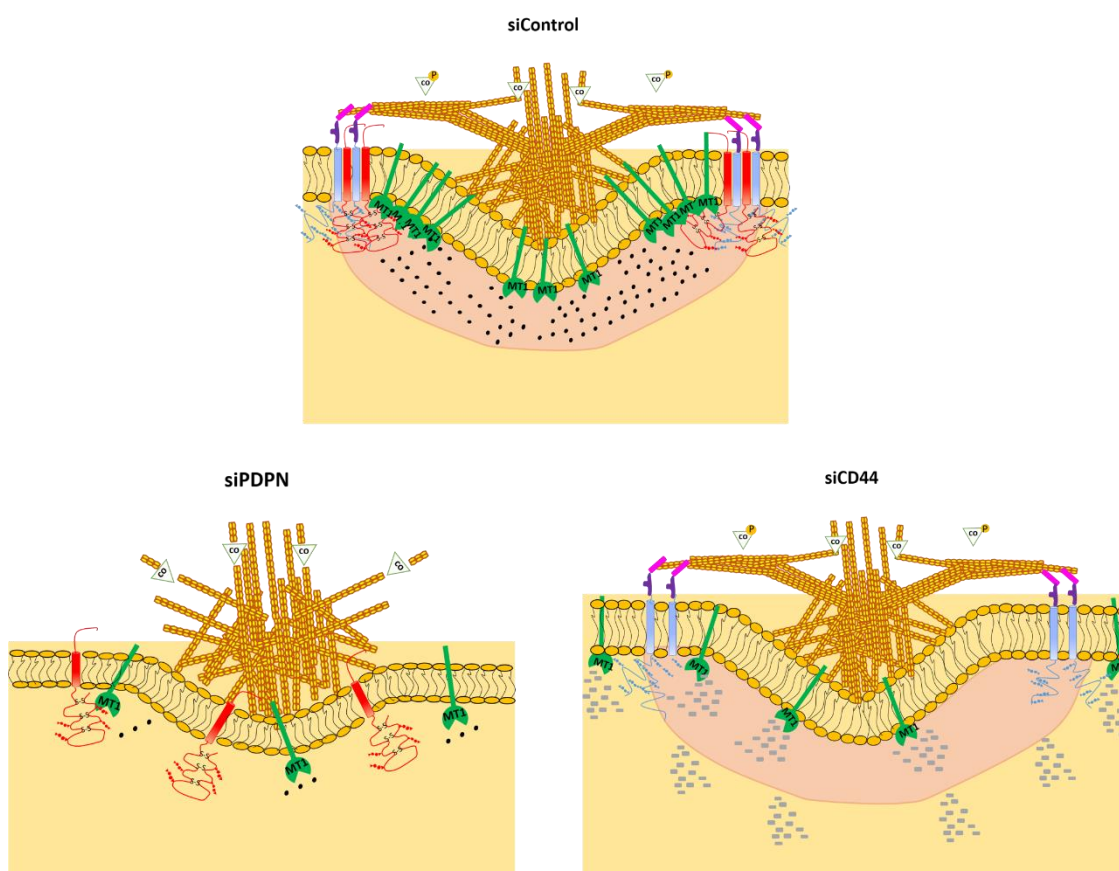


Figura 27. Esquema hipotético de la función de podoplanina y CD44 en el invadopodio de células SCC, según los resultados de esta tesis. En células que expresan podoplanina y CD44 (siControl), podoplanina promueve la estabilidad de los invadopodios activando la ruta RhoC GTPasa-ROCK-LIM quinasa, que conduce a la fosforilación e inactivación de cofilina (Martín-Villar et al, 2015). La inactivación de cofilina previene una excesiva fragmentación y despolimerización de F-actina. CD44, por otra parte, recluta MT1-MMP al invadopodio. Podoplanina, CD44 y MT1-MMP formarían un complejo en el invadopodio favoreciendo la degradación focal de la MEC. En células deficientes en podoplanina (siPDPN), la actividad de cofilina aumenta provocando una excesiva fragmentación de F-actina y la inestabilidad del invadopodio, lo que redundaría en una deficiente actividad proteolítica. En células deficientes en CD44 (siCD44), aunque la presencia de podoplanina mantiene la estabilidad del invadopodio, la ausencia de CD44 provoca una cierta deslocalización de MT1-MMP (podoplanina *per se* podría retener un cierto número de moléculas de la proteasa para mantener la degradación focal asociada al invadopodio) y, posiblemente, de otras MMPs, favoreciendo una proteólisis descontrolada de la MEC.

La cooperación entre CD44 y podoplanina es también clave en la invasión de las células de carcinoma a través de la membrana basal y en su actividad proteolítica. En este caso, el silenciamiento individual de cada proteína tuvo un efecto similar en la disminución de la invasividad de las células, que contrasta con lo observado en la formación de invadopodios activos. Este resultado sugiere que la penetración de las células en la membrana basal requiere de otros mecanismos, además de los invadopodios. Es probable que el silenciamiento de podoplanina y CD44 afecte a la migración de las células a través de la densa malla tridimensional que constituye la membrana basal. Por otra parte, el silenciamiento de CD44, a diferencia del silenciamiento de podoplanina, en estas células no bloqueó completamente la degradación de la membrana basal (aunque las diferencias no fueron significativas estadísticamente), lo que está más en consonancia con los ensayos de formación de invadopodios sobre gelatina, y sugiere que la degradación anómala observada tras el silenciamiento de CD44 en los ensayos de gelatina es poco efectiva en un contexto fisiológico. No obstante, una limitación de estos experimentos es que se midió la degradación de la membrana basal por la intensidad de fluorescencia de uno sólo de sus componentes, laminina 5, y, quizás, el efecto de los silenciamientos de podoplanina y CD44 sobre la degradación de otras proteínas, como colágeno IV, podría ser distinto.

Posible implicación de la asociación podoplanina-CD44 en la citocinesis

Finalmente, un resultado colateral de nuestros experimentos, fue la observación de que el silenciamiento de CD44, pero no el de podoplanina, induce un aumento significativo del número de células binucleadas, un fenotipo que desaparece tras el silenciamiento simultáneo de ambas proteínas. Estas observaciones sugieren un papel de la interacción podoplanina-CD44 en el control de la división celular y/o la citocinesis. Un análisis de inmunofluorescencia con un anticuerpo contra pericentrina para detectar aberraciones en el número de centrosomas fue negativo (datos no mostrados), lo que parece descartar anomalías en la división celular ([Gönczy, 2015](#)) y apunta a alteraciones en la citocinesis. De nuevo, el papel de podoplanina parece ser preponderante, pero requiere a CD44, principalmente CD44s, para un control efectivo de la citocinesis. La citocinesis es el proceso mediante el cual la célula en división, tras la segregación de los cromosomas, se escinde en dos células hijas. En este proceso intervienen tanto los microtúbulos como el citoesqueleto de actina. El huso central de los microtúbulos define la posición del plano de división entre los cromosomas segregados en anafase. Esta señal espacial se transmite a través de una ruta que implica a RhoA GTPasa, y conduce a la formación y contracción de un anillo de actina-miosina cortical situado en el plano ecuatorial de la célula, que origina el surco ("cleavage furrow") que conduce a la escisión de las dos células hijas ([Fededa](#)

DISCUSIÓN

[and Gerlich, 2012](#)). Como se ha mencionado anteriormente, tanto podoplanina como CD44 promueven reorganizaciones del citoesqueleto a través de su unión a proteínas ERM que las conectan con F-actina y la activación de Rho GTPasas, por lo que su implicación en la citocinesis no es descartable. Al mismo tiempo, resultados de nuestro laboratorio sugieren un papel de podoplanina en la organización de los microtúbulos durante la migración celular ([Martín-Villar et al., 2010](#)). En cualquier caso, la implicación de podoplanina y CD44 en la citocinesis es un objetivo a estudiar en el futuro.

CONCLUSIONES Y CONCLUSIONS

1. Podoplanina se expresa de forma coordinada con las isoformas CD44v y CD44s en la piel de ratón tras un estímulo pro-inflamatorio con TPA, coincidiendo con una hiperplasia de la epidermis. Además, tanto en células tumorales en cultivo representativas de distintos estadios de progresión de la carcinogénesis química de piel en ratón como en líneas celulares humanas de SCC, la expresión de podoplanina coincide con la de CD44s y/o CD44v.
2. En la progresión *in vitro* de carcinomas escamosos bien diferenciados a carcinomas pobremente diferenciados o fusocelulares (SCC-SpCC) se produce un cambio en la expresión de CD44v a CD44s. En líneas celulares de carcinoma fusocelular se expresa CD44v10 como única isoforma variable.
3. CD44v3-10, CD44v6-10 y CD44v8-10 son las principales isoformas variables que se expresan en líneas celulares humanas de carcinomas escamosos junto a CD44s y podoplanina.
4. En ensayos de co-inmunoprecipitación, podoplanina interacciona tanto con CD44s como con CD44v3-10, CD44v6-10 y CD44v8-10. Esta interacción ocurre principalmente a través del dominio transmembrana, pero requiere el dominio citoplasmático y se modula negativamente por la glicosilación del dominio extracelular.
5. Podoplanina co-localiza con CD44s y las isoformas CD44v en la membrana plasmática y en el anillo de adhesión de los invadopodios de células de carcinoma escamoso.
6. Podoplanina, y no CD44, promueve la formación de invadopodios estables activos. CD44 se requiere junto a podoplanina para el control espacial de la degradación de la matriz extracelular.
7. Tanto la estabilización de invadopodios mediada por podoplanina, como el control espacial de la degradación mediado por podoplanina y CD44, son necesarios para promover la invasión de células de carcinoma escamoso a través de una membrana basal nativa de mesenterio de ratón.
8. Podoplanina y CD44 cooperan durante la división celular de células de carcinoma escamoso para prevenir la formación de células binucleadas.

1. Podoplanin is coordinately expressed with CD44v and CD44s isoforms in mouse skin after a pro-inflammatory stimulus with TPA, coinciding with epidermal hyperplasia. In addition, podoplanin is expressed together with CD44s and/or CD44v, in both mouse cell lines representative of different stages of skin carcinogenesis progression and human SCC cell lines.
2. There is a switch from CD44v to CD44s expression during progression of well differentiated squamous cell carcinomas to poorly differentiated spindle cell carcinomas (SCC-SpCC). CD44v10 is the only variable isoform expressed in SpCC cell lines.
3. CD44v3-10, CD44v6-10 and CD44v8-10 are the main variable isoforms expressed in squamous carcinoma cell lines together with CD44s and podoplanin.
4. Podoplanin interacts with the CD44s isoform as well as with CD44v3-10, CD44v6-10 and CD44v8-10 isoforms in co-immunoprecipitation assays. This interaction is mediated primarily by the transmembrane domain, but requires the cytoplasmic tail and is modulated by glycosylation of the extracellular domain.
5. Podoplanin co-localizes with CD44s and CD44v isoforms on the plasma membrane and the adhesion ring of invadopodia in squamous carcinoma cells.
6. Podoplanin, but not CD44, promotes the formation of stable, active invadopodia. However, CD44 is necessary together with podoplanin for the spatial control of extracellular matrix degradation.
7. Both podoplanin-mediated invadopodia stabilization and podoplanin-CD44-mediated spatial control of extracellular matrix degradation are required to promote invasion of squamous carcinoma cells through a native basement membrane of mouse mesentery.
8. Podoplanin and CD44 cooperate during cell division of squamous carcinoma cells to prevent the formation of binucleated cells.

BIBLIOGRAFÍA

Abel, E.L., Angel, J.M., Kiguchi, K., DiGiovanni, J., 2009. Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamentals and applications. *Nat Protoc* 4, 1350–1362. <https://doi.org/10.1038/nprot.2009.120>

Acton, S.E., Astarita, J.L., Malhotra, D., Lukacs-Kornek, V., Franz, B., Hess, P.R., Jakus, Z., Kuligowski, M., Fletcher, A.L., Elpek, K.G., Bellemare-Pelletier, A., Sceats, L., Reynoso, E.D., Gonzalez, S.F., Graham, D.B., Chang, J., Peters, A., Woodruff, M., Kim, Y.-A., Swat, W., Morita, T., Kuchroo, V., Carroll, M.C., Kahn, M.L., Wucherpennig, K.W., Turley, S.J., 2012. Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. *Immunity* 37, 276–289. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.05.022>

Artym, V.V., Zhang, Y., Seillier-Moiseiwitsch, F., Yamada, K.M., Mueller, S.C., 2006. Dynamic interactions of cortactin and membrane type 1 matrix metalloproteinase at invadopodia: defining the stages of invadopodia formation and function. *Cancer Res.* 66, 3034–3043. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2177>

Astarita, J.L., Acton, S.E., Turley, S.J., 2012. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Front Immunol* 3, 283. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00283>

Astarita, J.L., Cremasco, V., Fu, J., Darnell, M.C., Peck, J.R., Nieves-Bonilla, J.M., Song, K., Kondo, Y., Woodruff, M.C., Gogineni, A., Onder, L., Ludewig, B., Weimer, R.M., Carroll, M.C., Mooney, D.J., Xia, L., Turley, S.J., 2015. The CLEC-2-podoplanin axis controls the contractility of fibroblastic reticular cells and lymph node microarchitecture. *Nat. Immunol.* 16, 75–84. <https://doi.org/10.1038/ni.3035>

Atsumi, N., Ishii, G., Kojima, M., Sanada, M., Fujii, S., Ochiai, A., 2008. Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 373, 36–41. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.05.163>

Beatty, B.T., Sharma, V.P., Bravo-Cordero, J.J., Simpson, M.A., Eddy, R.J., Koleske, A.J., Condeelis, J., 2013. $\beta 1$ integrin regulates Arg to promote invadopodial maturation and matrix degradation. *Mol. Biol. Cell* 24, 1661–1675, S1-11. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-12-0908>

Beham-Schmid, C., Heider, K.H., Hoeffler, G., Zatloukal, K., 1998. Expression of CD44 splice variant v10 in Hodgkin's disease is associated with aggressive behaviour and high risk of relapse. *J. Pathol.* 186, 383–389. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9896\(199812\)186:4<383::AID-PATH202>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9896(199812)186:4<383::AID-PATH202>3.0.CO;2-A)

Bourguignon, L.Y., Zhu, H., Chu, A., Iida, N., Zhang, L., Hung, M.C., 1997. Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation. *J. Biol. Chem.* 272, 27913–27918. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.44.27913>

Bourguignon, L.Y.W., Peyrolier, K., Gilad, E., Brightman, A., 2007. Hyaluronan-CD44 interaction with neural Wiskott-Aldrich syndrome protein (N-WASP) promotes actin polymerization and

BIBLIOGRAFÍA

ErbB2 activation leading to beta-catenin nuclear translocation, transcriptional up-regulation, and cell migration in ovarian tumor cells. *J. Biol. Chem.* 282, 1265–1280. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604672200>

Bourguignon, L.Y.W., Wong, G., Earle, C., Chen, L., 2012. Hyaluronan-CD44v3 interaction with Oct4-Sox2-Nanog promotes miR-302 expression leading to self-renewal, clonal formation, and cisplatin resistance in cancer stem cells from head and neck squamous cell carcinoma. *J. Biol. Chem.* 287, 32800–32824. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.308528>

Breiteneder-Geleff, S., Matsui, K., Soleiman, A., Meraner, P., Poczewski, H., Kalt, R., Schaffner, G., Kerjaschki, D., 1997. Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am. J. Pathol.* 151, 1141–1152.

Buchmann, A., Ruggeri, B., Klein-Szanto, A.J., Balmain, A., 1991. Progression of squamous carcinoma cells to spindle carcinomas of mouse skin is associated with an imbalance of H-ras alleles on chromosome 7. *Cancer Res.* 51, 4097–4101.

Burns, P.A., Kemp, C.J., Gannon, J.V., Lane, D.P., Bremner, R., Balmain, A., 1991. Loss of heterozygosity and mutational alterations of the p53 gene in skin tumours of interspecific hybrid mice. *Oncogene* 6, 2363–2369.

Carrasco-Ramírez, P., Greening, D.W., Andrés, G., Gopal, S.K., Martín-Villar, E., Renart, J., Simpson, R.J., Quintanilla, M., 2016. Podoplanin is a component of extracellular vesicles that reprograms cell-derived exosomal proteins and modulates lymphatic vessel formation. *Oncotarget* 7, 16070–16089. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7445>

Castro-Castro, A., Marchesin, V., Monteiro, P., Lodillinsky, C., Rossé, C., Chavrier, P., 2016. Cellular and Molecular Mechanisms of MT1-MMP-Dependent Cancer Cell Invasion. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 32, 555–576. <https://doi.org/10.1146/annurev-cellbio-111315-125227>
Caulín, C., Scholl, F.G., Frontelo, P., Gamallo, C., Quintanilla, M., 1995. Chronic exposure of cultured transformed mouse epidermal cells to transforming growth factor-beta 1 induces an epithelial-mesenchymal transdifferentiation and a spindle tumoral phenotype. *Cell Growth Differ.* 6, 1027–1035.

Chabadel, A., Bañón-Rodríguez, I., Cluet, D., Rudkin, B.B., Wehrle-Haller, B., Genot, E., Jurdic, P., Anton, I.M., Saltel, F., 2007. CD44 and beta3 integrin organize two functionally distinct actin-based domains in osteoclasts. *Mol. Biol. Cell* 18, 4899–4910. <https://doi.org/10.1091/mbc.e07-04-0378>

Chen, W.-S., Cao, Z., Sugaya, S., Lopez, M.J., Sendra, V.G., Laver, N., Leffler, H., Nilsson, U.J., Fu, J., Song, J., Xia, L., Hamrah, P., Panjwani, N., 2016. Pathological lymphangiogenesis is modulated by galectin-8-dependent crosstalk between podoplanin and integrin-associated VEGFR-3. *Nat Commun* 7, 11302. <https://doi.org/10.1038/ncomms11302>

Cho, Z., Konishi, E., Kanemaru, M., Isohisa, T., Arita, T., Kawai, M., Tsutsumi, M., Mizutani, H., Takenaka, H., Ozawa, T., Tsuruta, D., Katoh, N., Asai, J., 2017. Podoplanin expression in peritumoral keratinocytes predicts aggressive behavior in extramammary Paget's disease. *J. Dermatol. Sci.* 87, 29–35. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.03.012>

Choi, E.-S., Kim, H., Kim, H.-P., Choi, Y., Goh, S.-H., 2017. CD44v8-10 as a potential theranostic biomarker for targeting disseminated cancer cells in advanced gastric cancer. *Sci Rep* 7, 4930. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05247-7>

Christofori, G., 2006. New signals from the invasive front. *Nature* 441, 444–450. <https://doi.org/10.1038/nature04872>

Cueni, L.N., Detmar, M., 2009. Galectin-8 interacts with podoplanin and modulates lymphatic endothelial cell functions. *Exp. Cell Res.* 315, 1715–1723. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.02.021>

Cui, W., Fowles, D.J., Bryson, S., Duffie, E., Ireland, H., Balmain, A., Akhurst, R.J., 1996. TGFbeta1 inhibits the formation of benign skin tumors, but enhances progression to invasive spindle carcinomas in transgenic mice. *Cell* 86, 531–542. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)80127-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)80127-0)

Dahlrot, R.H., Hermansen, S.K., Hansen, S., Kristensen, B.W., 2013. What is the clinical value of cancer stem cell markers in gliomas? *Int J Clin Exp Pathol* 6, 334–348.

Denhardt, D.T., Noda, M., O'Regan, A.W., Pavlin, D., Berman, J.S., 2001. Osteopontin as a means to cope with environmental insults: regulation of inflammation, tissue remodeling, and cell survival. *J. Clin. Invest.* 107, 1055–1061. <https://doi.org/10.1172/JCI12980>

Di Martino, J., Henriot, E., Ezzoukhry, Z., Goetz, J.G., Moreau, V., Saltel, F., 2016. The microenvironment controls invadosome plasticity. *J. Cell. Sci.* 129, 1759–1768. <https://doi.org/10.1242/jcs.182329>

Diaz-Guerra, M., Haddow, S., Bauluz, C., Jorcano, J.L., Cano, A., Balmain, A., Quintanilla, M., 1992. Expression of simple epithelial cytokeratins in mouse epidermal keratinocytes harboring Harvey ras gene alterations. *Cancer Res.* 52, 680–687.

Erb, U., Megaptche, A.P., Gu, X., Büchler, M.W., Zöller, M., 2014. CD44 standard and CD44v10 isoform expression on leukemia cells distinctly influences niche embedding of hematopoietic stem cells. *J Hematol Oncol* 7, 29. <https://doi.org/10.1186/1756-8722-7-29>

Fededa, J.P., Gerlich, D.W., 2012. Molecular control of animal cell cytokinesis. *Nat. Cell Biol.* 14, 440–447. <https://doi.org/10.1038/ncb2482>

BIBLIOGRAFÍA

Fernández-Muñoz, B., Yurrita, M.M., Martín-Villar, E., Carrasco-Ramírez, P., Megías, D., Renart, J., Quintanilla, M., 2011. The transmembrane domain of podoplanin is required for its association with lipid rafts and the induction of epithelial-mesenchymal transition. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 886–896. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2011.02.010>

Flachbartová, Z., Kovacech, B., 2013. Mortalin - a multipotent chaperone regulating cellular processes ranging from viral infection to neurodegeneration. *Acta Virol.* 57, 3–15.

Friedl, P., Hegerfeldt, Y., Tusch, M., 2004. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *Int. J. Dev. Biol.* 48, 441–449. <https://doi.org/10.1387/ijdb.041821>

Fusenig, N.E., Amer, S.M., Boukamp, P., Worst, P.K., 1978. Characteristics of chemically transformed mouse epidermal cells in vitro and in vivo. *Bull Cancer* 65, 271–279.

Gandarillas, A., Scholl, F.G., Benito, N., Gamallo, C., Quintanilla, M., 1997. Induction of PA2.26, a cell-surface antigen expressed by active fibroblasts, in mouse epidermal keratinocytes during carcinogenesis. *Mol. Carcinog.* 20, 10–18. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2744\(199709\)20:1<10::aid-mc3>3.0.co;2-m](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2744(199709)20:1<10::aid-mc3>3.0.co;2-m)

García, E. 2014. Roles of WIP and WICH/WIRE proteins in formation and maturation of invasive protrusions in human breast cancer cells. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

Goldie, S.J., Chincarini, G., Darido, C., 2019. Targeted Therapy Against the Cell of Origin in Cutaneous Squamous Cell Carcinoma. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20092201>
Gönczy, P., 2015. Centrosomes and cancer: revisiting a long-standing relationship. *Nat. Rev. Cancer* 15, 639–652. <https://doi.org/10.1038/nrc3995>

Govindaraju, P., Todd, L., Shetye, S., Monslow, J., Puré, E., 2019. CD44-dependent inflammation, fibrogenesis, and collagenolysis regulates extracellular matrix remodeling and tensile strength during cutaneous wound healing. *Matrix Biol.* 75–76, 314–330. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.06.004>

Green, A.C., Olsen, C.M., 2017. Cutaneous squamous cell carcinoma: an epidemiological review. *Br. J. Dermatol.* 177, 373–381. <https://doi.org/10.1111/bjd.15324>

Günthert, U., Hofmann, M., Rudy, W., Reber, S., Zöller, M., Haussmann, I., Matzku, S., Wenzel, A., Ponta, H., Herrlich, P., 1991. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65, 13–24. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90403-l](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90403-l)

Hanahan, D., Weinberg, R.A., 2000. The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)

Hao, J., Chen, H., Madigan, M.C., Cozzi, P.J., Beretov, J., Xiao, W., Delprado, W.J., Russell, P.J., Li, Y., 2010. Co-expression of CD147 (EMMPRIN), CD44v3-10, MDR1 and monocarboxylate transporters is associated with prostate cancer drug resistance and progression. *Br. J. Cancer* 103, 1008–1018. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605839>

Hiraga, T., Nakamura, H., 2016. Comparable roles of CD44v8-10 and CD44s in the development of bone metastases in a mouse model. *Oncol Lett* 12, 2962–2969. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.4985>

Hoshino, D., Kirkbride, K.C., Costello, K., Clark, E.S., Sinha, S., Grega-Larson, N., Tyska, M.J., Weaver, A.M., 2013. Exosome secretion is enhanced by invadopodia and drives invasive behavior. *Cell Rep* 5, 1159–1168. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.10.050>

Hudson, D.L., Speight, P.M., Watt, F.M., 1996. Altered expression of CD44 isoforms in squamous-cell carcinomas and cell lines derived from them. *Int. J. Cancer* 66, 457–463. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0215\(19960516\)66:4<457::AID-IJC8>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0215(19960516)66:4<457::AID-IJC8>3.0.CO;2-V)

Hwang, Y.S., Xianglan, Z., Park, K.-K., Chung, W.-Y., 2012. Functional invadopodia formation through stabilization of the PDPN transcript by IMP-3 and cancer-stromal crosstalk for PDPN expression. *Carcinogenesis* 33, 2135–2146. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs258>

Islam, F., Gopalan, V., Wahab, R., Smith, R.A., Lam, A.K.-Y., 2015. Cancer stem cells in oesophageal squamous cell carcinoma: Identification, prognostic and treatment perspectives. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 96, 9–19. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2015.04.007>

Itoh, Y., Seiki, M., 2006. MT1-MMP: a potent modifier of pericellular microenvironment. *J. Cell. Physiol.* 206, 1–8. <https://doi.org/10.1002/jcp.20431>

Jou, A., Hess, J., 2017. Epidemiology and Molecular Biology of Head and Neck Cancer. *Oncol Res Treat* 40, 328–332. <https://doi.org/10.1159/000477127>

Kagami, T., Yamade, M., Suzuki, T., Uotani, T., Tani, S., Hamaya, Y., Iwaizumi, M., Osawa, S., Sugimoto, K., Baba, S., Sugimura, H., Miyajima, H., Furuta, T., 2018. High expression level of CD44v8-10 in cancer stem-like cells is associated with poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma patients treated with chemoradiotherapy. *Oncotarget* 9, 34876–34888. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.26172>

Kajita, M., Itoh, Y., Chiba, T., Mori, H., Okada, A., Kinoh, H., Seiki, M., 2001. Membrane-type 1 matrix metalloproteinase cleaves CD44 and promotes cell migration. *J. Cell Biol.* 153, 893–904. <https://doi.org/10.1083/jcb.153.5.893>

Kaneko, M.K., Kato, Y., Kameyama, A., Ito, H., Kuno, A., Hirabayashi, J., Kubota, T., Amano, K., Chiba, Y., Hasegawa, Y., Sasagawa, I., Mishima, K., Narimatsu, H., 2007. Functional glycosylation of human podoplanin: glycan structure of platelet aggregation-inducing factor. *FEBS Lett.* 581, 331–336. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.12.044>

BIBLIOGRAFÍA

Kaneko, M.K., Kato, Y., Kitano, T., Osawa, M., 2006. Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/podoplanin as a platelet aggregation-inducing factor. *Gene* 378, 52–57. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.04.023>

Kaya, G., Rodriguez, I., Jorcano, J.L., Vassalli, P., Stamenkovic, I., 1999. Cutaneous delayed-type hypersensitivity response is inhibited in transgenic mice with keratinocyte-specific CD44 expression defect. *J. Invest. Dermatol.* 113, 137–138. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.1999.00642.x>

Kolenda, J., Jensen, S.S., Aaberg-Jessen, C., Christensen, K., Andersen, C., Brünner, N., Kristensen, B.W., 2011. Effects of hypoxia on expression of a panel of stem cell and chemoresistance markers in glioblastoma-derived spheroids. *J. Neurooncol.* 103, 43–58. <https://doi.org/10.1007/s11060-010-0357-8>

König, H., Moll, J., Ponta, H., Herrlich, P., 1996. Trans-acting factors regulate the expression of CD44 splice variants. *EMBO J.* 15, 4030–4039.

Krishnan, H., Retzbach, E.P., Ramirez, M.I., Liu, T., Li, H., Miller, W.T., Goldberg, G.S., 2015. PKA and CDK5 can phosphorylate specific serines on the intracellular domain of podoplanin (PDPN) to inhibit cell motility. *Exp. Cell Res.* 335, 115–122. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.04.019>

Krolikoski, M., Monslow, J., Puré, E., 2019. The CD44-HA axis and inflammation in atherosclerosis: A temporal perspective. *Matrix Biol.* 78–79, 201–218. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2018.05.007>

Kulesz-Martin, M., Kilkenny, A.E., Holbrook, K.A., Digernes, V., Yuspa, S.H., 1983. Properties of carcinogen altered mouse epidermal cells resistant to calcium-induced terminal differentiation. *Carcinogenesis* 4, 1367–1377. <https://doi.org/10.1093/carcin/4.11.1367>

Kunita, A., Kashima, T.G., Morishita, Y., Fukayama, M., Kato, Y., Tsuruo, T., Fujita, N., 2007. The platelet aggregation-inducing factor aggrus/podoplanin promotes pulmonary metastasis. *Am. J. Pathol.* 170, 1337–1347. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2007.060790>

Lamouille, S., Xu, J., Derynck, R., 2014. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 178–196. <https://doi.org/10.1038/nrm3758>

Lau, W.M., Teng, E., Chong, H.S., Lopez, K.A.P., Tay, A.Y.L., Salto-Tellez, M., Shabbir, A., So, J.B.Y., Chan, S.L., 2014. CD44v8-10 is a cancer-specific marker for gastric cancer stem cells. *Cancer Res.* 74, 2630–2641. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-2309>

Lee, L.-N., Kuo, S.-H., Lee, Y.-C., Chang, Y.-L., Chang, H.-C., Jan, I.-S., Yang, P.-C., 2005. CD44 splicing pattern is associated with disease progression in pulmonary adenocarcinoma. *J. Formos. Med. Assoc.* 104, 541–548.

Li, Y.-Y., Zhou, C.-X., Gao, Y., 2015. Podoplanin promotes the invasion of oral squamous cell carcinoma in coordination with MT1-MMP and Rho GTPases. *Am J Cancer Res* 5, 514–529.

Linardopoulos, S., Street, A.J., Quelle, D.E., Parry, D., Peters, G., Sherr, C.J., Balmain, A., 1995. Deletion and altered regulation of p16INK4a and p15INK4b in undifferentiated mouse skin tumors. *Cancer Res.* 55, 5168–5172.

Liu, J., Yue, P., Artym, V.V., Mueller, S.C., Guo, W., 2009. The role of the exocyst in matrix metalloproteinase secretion and actin dynamics during tumor cell invadopodia formation. *Mol. Biol. Cell* 20, 3763–3771. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-09-0967>

Lohmer, L.L., Kelley, L.C., Hagedorn, E.J., Sherwood, D.R., 2014. Invadopodia and basement membrane invasion in vivo. *Cell Adh Migr* 8, 246–255. <https://doi.org/10.4161/cam.28406>

Marhaba, R., Zöller, M., 2004. CD44 in cancer progression: adhesion, migration and growth regulation. *J. Mol. Histol.* 35, 211–231.

Martín-Villar, E., Borda-d'Agua, B., Carrasco-Ramirez, P., Renart, J., Parsons, M., Quintanilla, M., Jones, G.E., 2015. Podoplanin mediates ECM degradation by squamous carcinoma cells through control of invadopodia stability. *Oncogene* 34, 4531–4544. <https://doi.org/10.1038/onc.2014.388>

Martín-Villar, E., Fernández-Muñoz, B., Parsons, M., Yurrita, M.M., Megías, D., Pérez-Gómez, E., Jones, G.E., Quintanilla, M., 2010. Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. *Mol. Biol. Cell* 21, 4387–4399. <https://doi.org/10.1091/mbc.E10-06-0489>

Martín-Villar, E., Megías, D., Castel, S., Yurrita, M.M., Vilaró, S., Quintanilla, M., 2006. Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell. Sci.* 119, 4541–4553. <https://doi.org/10.1242/jcs.03218>

Martín-Villar, E., Scholl, F.G., Gamallo, C., Yurrita, M.M., Muñoz-Guerra, M., Cruces, J., Quintanilla, M., 2005. Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int. J. Cancer* 113, 899–910. <https://doi.org/10.1002/ijc.20656>

Matzke-Ogi, A., Jannasch, K., Shatirishvili, M., Fuchs, B., Chiblak, S., Morton, J., Tawk, B., Lindner, T., Sansom, O., Alves, F., Warth, A., Schwager, C., Mier, W., Kleeff, J., Ponta, H., Abdollahi, A., Orian-Rousseau, V., 2016. Inhibition of Tumor Growth and Metastasis in Pancreatic Cancer Models by Interference With CD44v6 Signaling. *Gastroenterology* 150, 513-525.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.10.020>

BIBLIOGRAFÍA

Méry, B., Rancoule, C., Guy, J.-B., Espenel, S., Wozny, A.-S., Battiston-Montagne, P., Ardail, D., Beuve, M., Alphonse, G., Rodriguez-Lafrasse, C., Magné, N., 2017. Preclinical models in HNSCC: A comprehensive review. *Oral Oncol.* 65, 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.12.010>

Miyashita, T., Higuchi, Y., Kojima, M., Ochiai, A., Ishii, G., 2017. Single cell time-lapse analysis reveals that podoplanin enhances cell survival and colony formation capacity of squamous cell carcinoma cells. *Sci Rep* 7, 39971. <https://doi.org/10.1038/srep39971>

Morath, I., Hartmann, T.N., Orian-Rousseau, V., 2016. CD44: More than a mere stem cell marker. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 81, 166–173. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2016.09.009>

Mueller, M.M., 2006. Inflammation in epithelial skin tumours: old stories and new ideas. *Eur. J. Cancer* 42, 735–744. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2006.01.014>

Murphy, D.A., Courtneidge, S.A., 2011. The “ins” and “outs” of podosomes and invadopodia: characteristics, formation and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 413–426. <https://doi.org/10.1038/nrm3141>

Nakazawa, Y., Sato, S., Naito, M., Kato, Y., Mishima, K., Arai, H., Tsuruo, T., Fujita, N., 2008. Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis. *Blood* 112, 1730–1739. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-11-124693>

Naor, D., Sionov, R.V., Ish-Shalom, D., 1997. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv. Cancer Res.* 71, 241–319. [https://doi.org/10.1016/s0065-230x\(08\)60101-3](https://doi.org/10.1016/s0065-230x(08)60101-3)

Navarro, P., Gómez, M., Pizarro, A., Gamallo, C., Quintanilla, M., Cano, A., 1991. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J. Cell Biol.* 115, 517–533. <https://doi.org/10.1083/jcb.115.2.517>

Orian-Rousseau, V., 2015. CD44 Acts as a Signaling Platform Controlling Tumor Progression and Metastasis. *Front Immunol* 6, 154. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00154>

Orian-Rousseau, V., 2010. CD44, a therapeutic target for metastasising tumours. *Eur. J. Cancer* 46, 1271–1277. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2010.02.024>

Orian-Rousseau, V., Chen, L., Sleeman, J.P., Herrlich, P., Ponta, H., 2002. CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev.* 16, 3074–3086. <https://doi.org/10.1101/gad.242602>

Orian-Rousseau, V., Sleeman, J., 2014. CD44 is a multidomain signaling platform that integrates extracellular matrix cues with growth factor and cytokine signals. *Adv. Cancer Res.* 123, 231–254. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800092-2.00009-5>

Parekh, A., Weaver, A.M., 2016. Regulation of invadopodia by mechanical signaling. *Exp. Cell Res.* 343, 89–95. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2015.10.038>

Paterson, E.K., Courtneidge, S.A., 2018. Invadosomes are coming: new insights into function and disease relevance. *FEBS J.* 285, 8–27. <https://doi.org/10.1111/febs.14123>

Petropoulos, C., Guichet, P.-O., Masliantsev, K., Wager, M., Karayan-Tapon, L., 2018. Functional invadopodia formed in glioblastoma stem cells are important regulators of tumor angiogenesis. *Oncotarget* 9, 20640–20657. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.25045>

Ponta, H., Sherman, L., Herrlich, P.A., 2003. CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4, 33–45. <https://doi.org/10.1038/nrm1004>

Preca, B.-T., Bajdak, K., Mock, K., Sundararajan, V., Pfannstiel, J., Maurer, J., Wellner, U., Hopt, U.T., Brummer, T., Brabletz, S., Brabletz, T., Stemmler, M.P., 2015. A self-enforcing CD44s/ZEB1 feedback loop maintains EMT and stemness properties in cancer cells. *Int. J. Cancer* 137, 2566–2577. <https://doi.org/10.1002/ijc.29642>

Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F., Ailles, L.E., 2007. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 973–978. <https://doi.org/10.1073/pnas.0610117104>

Prochazka, L., Tesarik, R., Turanek, J., 2014. Regulation of alternative splicing of CD44 in cancer. *Cell. Signal.* 26, 2234–2239. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2014.07.011>

Protin, U., Schweighoffer, T., Jochum, W., Hilberg, F., 1999. CD44-deficient mice develop normally with changes in subpopulations and recirculation of lymphocyte subsets. *J. Immunol.* 163, 4917–4923.

Quintanilla, M., Brown, K., Ramsden, M., Balmain, A., 1986. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature* 322, 78–80. <https://doi.org/10.1038/322078a0>

Quintanilla, M., Montero-Montero, L., Renart, J., Martín-Villar, E., 2019. Podoplanin in Inflammation and Cancer. *Int J Mol Sci* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20030707>

BIBLIOGRAFÍA

Rahadiani, N., Ikeda, J., Makino, T., Tian, T., Qiu, Y., Mamat, S., Wang, Y., Doki, Y., Aozasa, K., Morii, E., 2010. Tumorigenic role of podoplanin in esophageal squamous-cell carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* 17, 1311–1323. <https://doi.org/10.1245/s10434-009-0895-5>

Rajarajan, A., Stokes, A., Bloor, B.K., Ceder, R., Desai, H., Grafström, R.C., Odell, E.W., 2012. CD44 expression in oro-pharyngeal carcinoma tissues and cell lines. *PLoS ONE* 7, e28776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028776>

Ramos, C., 2018. RELEVANCIA DE LA INTERACCIÓN PODOPLANINA-CD44 PARA LA PROGRESIÓN TUMORAL. Identificación de CD44v10 como marcador potencial de la transición epitelio-mesénquima y la progresión a carcinomas indiferenciados. Trabajo fin de grado. Universidad Autónoma de Madrid.

Reategui, E.P., de Mayolo, A.A., Das, P.M., Astor, F.C., Singal, R., Hamilton, K.L., Goodwin, W.J., Carraway, K.L., Franzmann, E.J., 2006. Characterization of CD44v3-containing isoforms in head and neck cancer. *Cancer Biol. Ther.* 5, 1163–1168. <https://doi.org/10.4161/cbt.5.9.3065>

Renart, J., Carrasco-Ramírez, P., Fernández-Muñoz, B., Martín-Villar, E., Montero, L., Yurrita, M.M., Quintanilla, M., 2015. New insights into the role of podoplanin in epithelial-mesenchymal transition. *Int Rev Cell Mol Biol* 317, 185–239. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2015.01.009>

Renart, J., San Mauro, D., Agorreta, A., Rutherford, K., Gemmell, N.J., Quintanilla, M., 2018. Evolutionary history of the podoplanin gene. *Gene Reports* 13, 28–37. <https://doi.org/10.1016/j.genrep.2018.08.005>

Ruggeri, B., Caamano, J., Goodrow, T., DiRado, M., Bianchi, A., Trono, D., Conti, C.J., Klein-Szanto, A.J., 1991. Alterations of the p53 tumor suppressor gene during mouse skin tumor progression. *Cancer Res.* 51, 6615–6621.

Sánchez-Danés, A., Larsimont, J.-C., Liagre, M., Muñoz-Couselo, E., Lapouge, G., Brisebarre, A., Dubois, C., Suppa, M., Sukumaran, V., Del Marmol, V., Tabernero, J., Blanpain, C., 2018. A slow-cycling LGR5 tumour population mediates basal cell carcinoma relapse after therapy. *Nature* 562, 434–438. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0603-3>

Scales, T.M.E., Jayo, A., Obara, B., Holt, M.R., Hotchin, N.A., Berditchevski, F., Parsons, M., 2013. $\alpha 3\beta 1$ integrins regulate CD151 complex assembly and membrane dynamics in carcinoma cells within 3D environments. *Oncogene* 32, 3965–3979. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.415>

Scholl, F.G., Gamallo, C., Quintanilla, M., 2000. Ectopic expression of PA2.26 antigen in epidermal keratinocytes leads to destabilization of adherens junctions and malignant progression. *Lab. Invest.* 80, 1749–1759. <https://doi.org/10.1038/labinvest.3780185>

Scholl, F.G., Gamallo, C., Vilaró, S., Quintanilla, M., 1999. Identification of PA2.26 antigen as a novel cell-surface mucin-type glycoprotein that induces plasma membrane extensions and increased motility in keratinocytes. *J. Cell. Sci.* 112 (Pt 24), 4601–4613.

Schoumacher, M., Glentis, A., Gurchenkov, V.V., Vignjevic, D.M., 2013. Basement membrane invasion assays: native basement membrane and chemoinvasion assay. *Methods Mol. Biol.* 1046, 133–144. https://doi.org/10.1007/978-1-62703-538-5_8

Screaton, G.R., Bell, M.V., Jackson, D.G., Cornelis, F.B., Gerth, U., Bell, J.I., 1992. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 12160–12164. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.24.12160>

Shatirishvili, M., Burk, A.S., Franz, C.M., Pace, G., Kastilan, T., Breuhahn, K., Hinterseer, E., Dierich, A., Bakiri, L., Wagner, E.F., Ponta, H., Hartmann, T.N., Tanaka, M., Orian-Rousseau, V., 2016. Epidermal-specific deletion of CD44 reveals a function in keratinocytes in response to mechanical stress. *Cell Death Dis* 7, e2461. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.342>

Skulsky, S.L., O'Sullivan, B., McArdle, O., Leader, M., Roche, M., Conlon, P.J., O'Neill, J.P., 2017. Review of high-risk features of cutaneous squamous cell carcinoma and discrepancies between the American Joint Committee on Cancer and NCCN Clinical Practice Guidelines In Oncology. *Head Neck* 39, 578–594. <https://doi.org/10.1002/hed.24580>

Sternlicht, M.D., Werb, Z., 2001. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 17, 463–516. <https://doi.org/10.1146/annurev.cellbio.17.1.463>

Sun, H., Liu, T., Zhu, D., Dong, X., Liu, F., Liang, X., Chen, C., Shao, B., Wang, M., Wang, Y., 2017. HnRNPM and CD44s expression affects tumor aggressiveness and predicts poor prognosis in breast cancer with axillary lymph node metastases. *Genes Chromosomes Cancer* 56, 598–607. <https://doi.org/10.1002/gcc.22463>

Suzuki-Inoue, K., 2011. Essential in vivo roles of the platelet activation receptor CLEC-2 in tumour metastasis, lymphangiogenesis and thrombus formation. *J. Biochem.* 150, 127–132. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr079>

Suzuki-Inoue, K., Osada, M., Ozaki, Y., 2017. Physiologic and pathophysiologic roles of interaction between C-type lectin-like receptor 2 and podoplanin: partners from in utero to adulthood. *J. Thromb. Haemost.* 15, 219–229. <https://doi.org/10.1111/jth.13590>

Tal, O., Lim, H.Y., Gurevich, I., Milo, I., Shipony, Z., Ng, L.G., Angeli, V., Shakhar, G., 2011. DC mobilization from the skin requires docking to immobilized CCL21 on lymphatic endothelium and intralymphatic crawling. *J. Exp. Med.* 208, 2141–2153. <https://doi.org/10.1084/jem.20102392>

BIBLIOGRAFÍA

Terawaki, S.-I., Kitano, K., Aoyama, M., Mori, T., Hakoshima, T., 2015. MT1-MMP recognition by ERM proteins and its implication in CD44 shedding. *Genes Cells* 20, 847–859. <https://doi.org/10.1111/gtc.12276>

Thiery, J.P., 2003. Epithelial–mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current Opinion in Cell Biology* 15, 740–746. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2003.10.006>

Thiery, J.P., 2002. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat. Rev. Cancer* 2, 442–454. <https://doi.org/10.1038/nrc822>

Thiery, J.P., Acloque, H., Huang, R.Y.J., Nieto, M.A., 2009. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 139, 871–890. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.007>

Thiery, J.P., Sleeman, J.P., 2006. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 131–142. <https://doi.org/10.1038/nrm1835>

Titus, M.A., Goodson, H.V., 2017. An evolutionary perspective on cell migration: Digging for the roots of amoeboid motility. *J. Cell Biol.* 216, 1509–1511. <https://doi.org/10.1083/jcb.201704112>

Tsukita, S., Oishi, K., Sato, N., Sagara, J., Kawai, A., Tsukita, S., 1994. ERM family members as molecular linkers between the cell surface glycoprotein CD44 and actin-based cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 126, 391–401. <https://doi.org/10.1083/jcb.126.2.391>

Tsuneki, M., Maruyama, S., Yamazaki, M., Xu, B., Essa, A., Abé, T., Babkair, H., Cheng, J., Yamamoto, T., Saku, T., 2013. Extracellular heat shock protein A9 is a novel interaction partner of podoplanin in oral squamous cell carcinoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 434, 124–130. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.03.057>

Wang, S.J., Bourguignon, L.Y.W., 2011. Role of hyaluronan-mediated CD44 signaling in head and neck squamous cell carcinoma progression and chemoresistance. *Am. J. Pathol.* 178, 956–963. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2010.11.077>

Wang, S.J., Wreesmann, V.B., Bourguignon, L.Y.W., 2007. Association of CD44 V3-containing isoforms with tumor cell growth, migration, matrix metalloproteinase expression, and lymph node metastasis in head and neck cancer. *Head Neck* 29, 550–558. <https://doi.org/10.1002/hed.20544>

Weaver, A.M., 2006. Invadopodia: specialized cell structures for cancer invasion. *Clin. Exp. Metastasis* 23, 97–105. <https://doi.org/10.1007/s10585-006-9014-1>

Wicki, A., Lehenbre, F., Wick, N., Hantusch, B., Kerjaschki, D., Christofori, G., 2006. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: Podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell* 9, 261–272. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.010>

Winde, C.M. de, Makris, S., Millward, L., Benjamin, A.C., Cazzagon, G., Martinez, V.G., Acton, S.E., 2019. Podoplanin function is switched by partner proteins on fibroblastic reticular cells. *bioRxiv* 793141. <https://doi.org/10.1101/793141>

Xu, H., Tian, Y., Yuan, X., Wu, H., Liu, Q., Pestell, R.G., Wu, K., 2015. The role of CD44 in epithelial-mesenchymal transition and cancer development. *Onco Targets Ther* 8, 3783–3792. <https://doi.org/10.2147/OTT.S95470>

Yan, Y., Zuo, X., Wei, D., 2015. Concise Review: Emerging Role of CD44 in Cancer Stem Cells: A Promising Biomarker and Therapeutic Target. *Stem Cells Transl Med* 4, 1033–1043. <https://doi.org/10.5966/sctm.2015-0048>

Yu, Q., Stamenkovic, I., 1999. Localization of matrix metalloproteinase 9 to the cell surface provides a mechanism for CD44-mediated tumor invasion. *Genes Dev.* 13, 35–48. <https://doi.org/10.1101/gad.13.1.35>

Yu, W.-H., Woessner, J.F., McNeish, J.D., Stamenkovic, I., 2002. CD44 anchors the assembly of matrilysin/MMP-7 with heparin-binding epidermal growth factor precursor and ErbB4 and regulates female reproductive organ remodeling. *Genes Dev.* 16, 307–323. <https://doi.org/10.1101/gad.925702>

Yu, X., Zech, T., McDonald, L., Gonzalez, E.G., Li, A., Macpherson, I., Schwarz, J.P., Spence, H., Futó, K., Timpson, P., Nixon, C., Ma, Y., Anton, I.M., Visegrády, B., Insall, R.H., Oien, K., Blyth, K., Norman, J.C., Machesky, L.M., 2012. N-WASP coordinates the delivery and F-actin-mediated capture of MT1-MMP at invasive pseudopods. *J. Cell Biol.* 199, 527–544. <https://doi.org/10.1083/jcb.201203025>

Yurrita, M.M., Fernández-Muñoz, B., Del Castillo, G., Martín-Villar, E., Renart, J., Quintanilla, M., 2014. Podoplanin is a substrate of presenilin-1/ γ -secretase. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 46, 68–75. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2013.11.016>

Yuspa, S.H., Morgan, D., Lichti, U., Spangler, E.F., Michael, D., Kilkenny, A., Hennings, H., 1986. Cultivation and characterization of cells derived from mouse skin papillomas induced by an initiation-promotion protocol. *Carcinogenesis* 7, 949–958. <https://doi.org/10.1093/carcin/7.6.949>

Zhao, P., Xu, Y., Wei, Y., Qiu, Q., Chew, T.-L., Kang, Y., Cheng, C., 2016. The CD44s splice isoform is a central mediator for invadopodia activity. *J. Cell. Sci.* 129, 1355–1365. <https://doi.org/10.1242/jcs.171959>

BIBLIOGRAFÍA

Zheng, L., Baumann, U., Reymond, J.-L., 2004. An efficient one-step site-directed and site-saturation mutagenesis protocol. *Nucleic Acids Res.* 32, e115. <https://doi.org/10.1093/nar/gnh110>

Zhou, G., Liu, Z., Myers, J.N., 2016. TP53 Mutations in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma and Their Impact on Disease Progression and Treatment Response. *J. Cell. Biochem.* 117, 2682–2692. <https://doi.org/10.1002/jcb.25592>

Zöller, M., 2011. CD44: can a cancer-initiating cell profit from an abundantly expressed molecule? *Nat. Rev. Cancer* 11, 254–267. <https://doi.org/10.1038/nrc3023>

ANEXO I

Artículos relacionados con esta tesis

Renart J, Carrasco-Ramírez P, Fernández-Muñoz B, Martín-Villar E, Montero L, Yurrita MM and Quintanilla M. New insights into the role of podoplanin in the epithelial-mesenchymal transition. Int. Rev. Cell Mol. Biol., 317: 185-239, 2015 (R).

Quintanilla M, Carrasco-Ramírez P, Montero-Montero L, Ramírez-López A, da Silva IL, Renart J, Martín-Villar E. Podoplanin promotes malignancy through a diversity of strategies. Can. Cell Microenviron., 3: e1384, 2016 (R).

Quintanilla M, Montero-Montero L, Renart J, Martín-Villar E. Podoplanin in inflammation and cancer. Int. J. Mol. Sci. 20, 707, 2019 (R).

ANEXO II

Artículos no relacionados con esta tesis

da Silva I L, Montero-Montero L, Martín-Villar E, Martín-Pérez J, Sainz Jr B, Renart J, Toscano Simões R, Soares Veloso E, Salviano Teixeira C, de Oliveira M C, Ferreira E, Quintanilla M. Reduced expression of the murine HLA-G homolog Qa-2 is associated with malignancy, epithelial-mesenchymal transition and stemness in breast cancer cells. *Sci. Rep.* 2017 Jul 24;7(1):6276. doi: 10.1038/s41598-017-06528-x. (A)

da Silva I L, Montero-Montero L, Ferreira E, Quintanilla M. New insights into the role of Qa-2 and HLA-G non-classical MHC-I complexes in malignancy. *Front Immunol.* 2018 Dec 6;9:2894 doi:10.3389/fimmu.2018.02894 (R)